



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



IBMCP
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Análisis de la variación genética natural de la fotomorfogénesis en *Arabidopsis thaliana*

Berta Sotillo Saúco

Tesis Doctoral

Director: M. A. Blázquez

Co-Director: D. Alabadi

Enero de 2016

El Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y el Dr. David Pablo Alabadí Diego, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas,

CERTIFICAN que la Licenciada en Bioquímica BERTA SOTILLO SAÚCO ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Análisis de la variación genética natural de la fotomorfogénesis en *Arabidopsis thaliana*”, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 16 de diciembre de 2015

Dr. Miguel A. Blázquez Rodríguez

Dr. David Alabadí Diego

Resumen

Después de la germinación, las plántulas pueden seguir dos programas de desarrollo alternativos, fotomorfogénesis o escotomorfogénesis, dependiendo de la presencia o ausencia de luz, respectivamente. La transición entre los dos programas está sometida a un estricto control hormonal; de este modo, las GAs reprimen la fotomorfogénesis en ausencia de luz. El principal objetivo de este trabajo es saber si esta regulación tiene un valor adaptativo. Se ha estudiado la variabilidad existente en 150 accesiones de *Arabidopsis thaliana* en la regulación de la fotomorfogénesis por las GAs y se han analizado características morfológicas que difieren entre los dos programas de desarrollo (ángulo entre cotiledones y longitud del hipocotilo) seleccionando 7 accesiones hipersensibles a la deficiencia de GAs, 7 accesiones intermedias, y 7 menos sensibles a la deficiencia de GAs. Se ha realizado un análisis de la secuencia de 8 genes (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*, *GAI*, *RGA*, *SLY1*, *HY5* y *PIF3*) implicados en la señalización de GAs en las 21 accesiones seleccionadas que no ha mostrado ninguna correlación clara entre variedades alélicas y la manifestación del fenotipo, salvo en el caso de la accesión Bla-1, que posee una versión truncada de *GAI*. Por otro lado se ha realizado un análisis transcriptómico y de QTLs de dos accesiones con comportamientos diferentes en ausencia de GAs, obteniendo 4 nuevos loci y 307 genes candidatos que podrían estar implicados en el proceso. Por último, se ha llevado a cabo un rastreo de factores de transcripción de *Arabidopsis* que podrían participar en la fotomorfogénesis, examinando dos fenotipos en oscuridad sin GAs: la apertura del gancho apical a los 3 días y la apertura de los cotiledones a los 7 días. Este análisis ha permitido demostrar que estos procesos son altamente sensibles a la actividad de factores de transcripción, mostrando una variación similar a la encontrada entre poblaciones naturales.

Resumen

Abstract

After germination, seedlings can follow two alternative development programs, photomorphogenesis or escotomorfogénesis, depending on the presence or absence of light, respectively. The transition between the two programs is under strict hormonal control; thus GAs repress photomorphogenesis in darkness. The main objective of this paper is whether this regulation has an adaptive value. We have studied the variability in 150 accessions of *Arabidopsis thaliana* in regulating the Photomorphogenesis by GAs and analyzed morphological characteristics that differ between the two development programs (angle between cotyledons and hypocotyl length) by selecting 7 accessions hypersensitive to GAs deficiency, 7 intermediate accessions, and 7 less sensitive to deficiency of GAs. We performed a sequence analysis of 8 genes (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*, *GAI*, *RGA*, *SLY1*, *HY5* and *PIF3*) involved in the signaling of GAs in the 21 selected accessions, that has shown no clear correlation between allelic varieties and the expression of the phenotype, except the accession Bla-1, which has a truncated version of *GAI*. On the other hand, there has been a transcriptome analysis and QTL analysis with two accessions with different behaviors in absence of GAs, obtaining 4 new loci and 307 candidate genes that may be involved in the process. Finally, it has undertaken a screening of transcription factors in *Arabidopsis* that could participate in Photomorphogenesis, examining two phenotypes in darkness without GAs: the opening of apical hook after 3 days and the opening of cotyledons after 7 days. This analysis has demonstrated that these processes are highly sensitive to the activity of transcription factors, showing a similar variation found among natural populations.

Resumen

Resum

Després de la germinació, les plàntules poden seguir dos programes de desenvolupament alternatius, fotomorfogènesi o escotomorfogènesi, depenent de la presència o absència de llum, respectivament. La transició entre els dos programes està sotmesa a un estricte control hormonal; d'aquesta manera, les GAs reprimeixen la fotomorfogènesi en absència de llum. El principal objectiu d'aquest treball és saber si aquesta regulació té un valor adaptatiu. S'ha estudiat la variabilitat existent en 150 accessions d'*Arabidopsis thaliana* en la regulació de la fotomorfogènesi per les GAs i s'han analitzat característiques morfològiques que difereixen entre els dos programes de desenvolupament (angle entre cotilèdons i longitud del hipocòtil) seleccionant 7 accessions hipersensibles a la deficiència de GAs, 7 accessions intermèdies, i 7 menys sensibles a la deficiència de GAs. S'ha realitzat una anàlisi de la seqüència de 8 gens (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*, *GAI*, *RGA*, *SLY1*, *HY5* i *PIF3*) implicats en la senyalització de GAs en les 21 accessions seleccionades que no ha mostrat cap correlació clara entre varietats al·lèliques i la manifestació del fenotip, excepte en el cas de l'accessió Bla-1, que posseeix una versió truncada de *GAI*. D'altra banda s'ha realitzat una anàlisi transcriptòmica i de QTLs de dos accessions amb comportaments diferents en absència de GAs, obtenint 4 nous loci i 307 gens candidats que podrien estar implicats en el procés. Finalment, s'ha dut a terme un rastreig de factors de transcripció d'*Arabidopsis* que podrien participar en la fotomorfogènesi, examinant dos fenotips en foscor sense GAs: l'obertura del ganxo apical als 3 dies i l'obertura dels cotilèdons als 7 dies. Aquesta anàlisi ha permès demostrar que aquests processos són altament sensibles a l'activitat de factors de transcripció, mostrant una variació similar a la trobada entre poblacions naturals.

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	3
Resum	5
1. Introducción.....	11
1.1 Plasticidad en el desarrollo	11
1.2 Fotomorfogénesis.....	13
1.3 Giberelinas	20
1.3.1 Biosíntesis de giberelinas:	20
1.3.2 Regulación del metabolismo de giberelinas:	23
1.3.3 Señalización por giberelinas:.....	28
1.3.4 Interacción de las giberelinas con otras hormonas:	35
1.4 Variación natural.....	36
2. Objetivos.....	43
3. Resultados.....	45
3.1 Efecto de la reducción de giberelinas sobre la fotomorfogénesis en poblaciones naturales.	45
3.2 Análisis transcricional de la respuesta a giberelinas en las accesiones <i>Ler</i> y <i>No-0</i>	54

Contenido

3.3	Estudio de asociación de genes candidatos.....	61
3.4	Caracterización funcional del alelo GAI^{Bla}	67
3.4.1	Acumulación celular de GAI^{Bla}	71
3.4.2	Localización de GAI^{Bla}	72
3.4.3	Dimerización de GAI^{Bla}	74
3.4.4	GAI^{Bla} como alelo dominante negativo.....	77
3.5	Análisis de QTL.....	79
3.5.1	Mapeo de caracteres múltiples:.....	81
3.5.2	Análisis de los QTLs detectados:.....	84
3.6	Estudio de la variabilidad en la respuesta a giberelinas debida a la actividad de factores de transcripción:.....	85
3.6.1	Rastreo de líneas homocigotas:.....	87
3.6.2	Comprobación de fenotipos extremos:.....	91
4.	Discusión.....	95
4.1	El valor adaptativo de la fotomorfogénesis:.....	95
4.2	Variabilidad transcriptómica de la fotomorfogénesis:.....	98
4.3	Otros loci implicados en fotomorfogénesis:.....	100
4.4	Otros factores de transcripción implicados en fotomorfogénesis:.....	101
5.	Conclusiones.....	103

6.	Materiales y métodos.....	105
6.1	Material vegetal y condiciones de cultivo.	105
6.1.1	Siembra y esterilización.....	105
6.1.2	Condiciones de crecimiento.....	106
6.1.3	Extracción DNA genómico, purificación y amplificación:	106
6.1.4	Secuenciación:	107
6.2	Análisis de las plántulas.....	109
6.3	Análisis transcriptómico mediante micromatrices.....	109
6.4	Ensayo del doble híbrido de levadura.....	110
6.5	Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC).....	112
6.6	Expresión transitoria.....	112
6.7	Extracción de proteínas de levadura	113
6.8	Western blot proteínas de levadura.....	113
6.9	Generación de líneas transgénicas	114
6.10	Análisis de QTLs.	115
6.11	Ensayos con β -glucuronidasa (GUS):.....	116
7.	Bibliografía.....	117
	Abreviaturas.....	135

Contenido

1. Introducción

1.1 Plasticidad en el desarrollo

La teoría de la evolución de Darwin plantea que la evolución de una especie es el resultado de las diferencias existentes en las tasas de reproducción y supervivencia de los individuos que la componen. En las teorías modernas, la evolución conlleva un cambio en la constitución genética de las poblaciones. De este modo, entre los individuos de una misma población existen cambios o variaciones a nivel morfológico, fisiológico y conductual, que se heredan según las leyes de Mendel y que tienen más o menos éxito en la supervivencia y reproducción de un individuo en un ambiente determinado.

Para que exista evolución es necesario, por tanto, que exista variación intra e interpoblacional, originada por la existencia de varios alelos en los diferentes loci genéticos. Por tanto, la variación natural genera distintos genotipos en una misma especie y un mismo genotipo puede generar distintos patrones de desarrollo o fenotipos en nichos diferentes, dando como resultado individuos que representan un mosaico de cualidades. La consecuencia de este tipo de mosaico en la creación de la variación individual y su importancia en la persistencia de la población y la evolución de adaptación a nuevos entornos, dependerá de si las características incorporadas responden de forma independiente o de forma integrada a los cambios ambientales y de si el potencial de adaptación se ve influenciado por estos caracteres (Ghalambor et al 2007).

Casi todo el desarrollo de las plantas es post-embionario, lo que implica que la planta puede modularlo o modificarlo dependiendo de las condiciones ambientales del entorno. Cualquier fluctuación en el medio ambiente que requiera un ajuste en el desarrollo y crecimiento de un organismo vegetal se considera una señal potencial (Casal et al 2004).

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias que les permiten seleccionar aquellos cambios ambientales que representan una señal para su desarrollo. Una de estas estrategias es la capacidad de anticipar cambios ambientales que ocurren de una forma cíclica, o de detectar cambios muy sutiles en el entorno como una variación en la calidad de la luz que perciben, y de esta manera poner en marcha las respuestas de desarrollo necesarias. La información que obtienen es procesada e integrada por factores endógenos como las hormonas o el reloj circadiano, que inducen cambios en el crecimiento y el desarrollo que facilitarán la correcta adaptación de la planta a su entorno (Figura 1). Esta capacidad de adaptación es lo que denominamos plasticidad (Casal et al 2004).

Las plantas reciben estímulos abióticos como la luz y la temperatura, o bióticos, como el ataque de insectos, que proporcionan las señales que modulan su desarrollo. Estos estímulos ambientales pueden generar grandes modificaciones en la planta que hagan que ésta se desarrolle gracias al estímulo o a pesar de éste. Las poblaciones con una elevada plasticidad en los rasgos más importantes pueden adaptarse fenotípicamente a las condiciones ambientales sin necesidad de una adaptación genética (Valladares et al 2007). De la misma manera, las

12

especies invasoras muestran una mayor plasticidad que las especies nativas con las que compiten, lo que les permite adaptarse rápidamente a una determinada área geográfica (Sultan 2003).

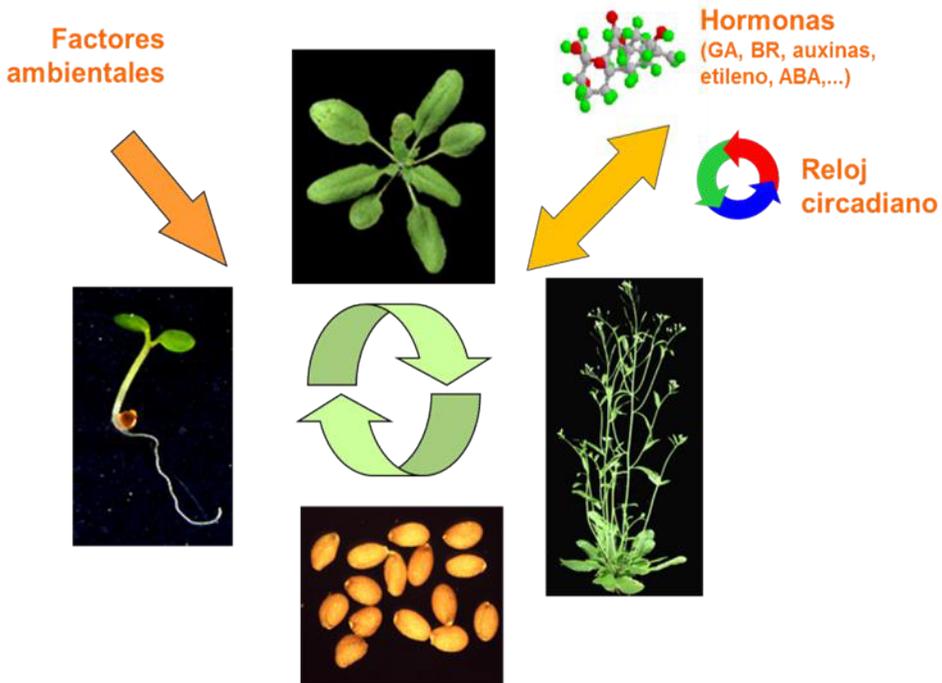


Figura 1. Plasticidad en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. En menos de dos meses, una planta de *Arabidopsis* completa su desarrollo a partir de semilla siempre que las condiciones sean las adecuadas.

1.2 Fotomorfogénesis

El ejemplo más temprano de plasticidad tiene lugar al finalizar la germinación. En este momento, las plantas pueden seguir dos

programas de desarrollo diferentes y alternativos dependiendo de si están creciendo en presencia de luz, fotomorfogénesis, o en oscuridad, escotomorfogénesis (Figura 2).

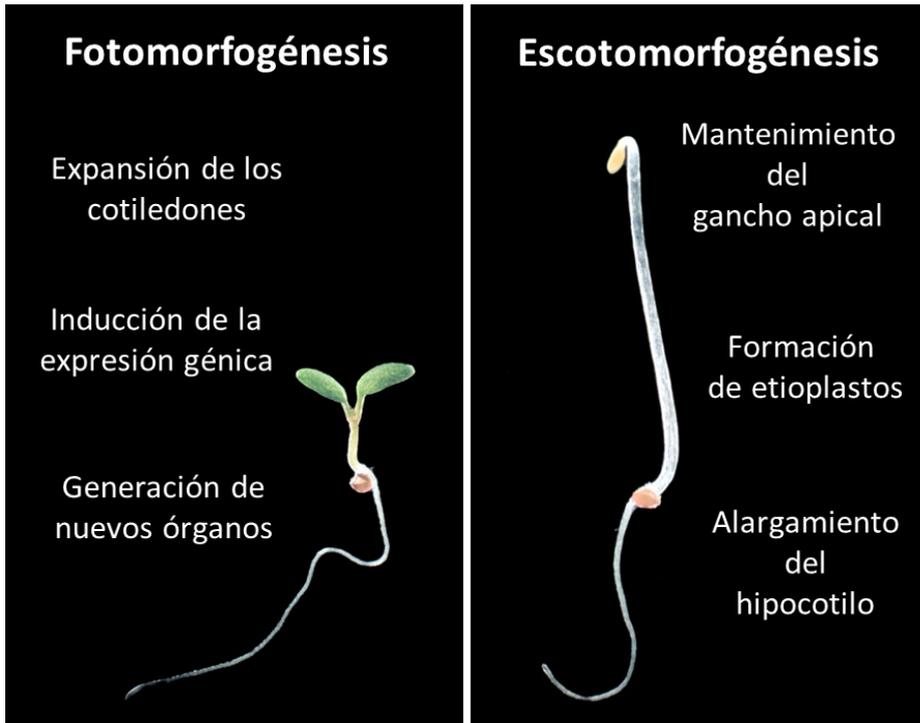


Figura 2. Diferencias fenotípicas entre la fotomorfogénesis y la escotomorfogénesis. Se muestran dos plántulas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en presencia y ausencia de luz, indicando los rasgos característicos de los dos programas de desarrollo.

El desarrollo escotomorfogénico se caracteriza por un crecimiento rápido del hipocotilo, unos cotiledones pequeños, blanquecinos, cerrados y plegados sobre sí mismos formando un gancho apical. Cuando la luz desencadena el desarrollo

fotomorfogénico, el crecimiento del hipocotilo se ralentiza y los cotiledones se abren y expanden (Holm and Deng 1999). La apariencia etiolada o blanca que confiere la escotomorfogénesis a las plántulas se debe a que contienen etioplastos en lugar de cloroplastos; además, la expresión de los genes que normalmente están inducidos por la luz se encuentra reprimida o se mantiene muy baja.

La fotosíntesis no es, por tanto, la fuerza motora en este momento del desarrollo y aunque la desetiación total implica la puesta en marcha de la fotosíntesis entre otros procesos, los cambios iniciales son inducidos por la fotomorfogénesis (del latín “creación de nuevas formas dependientes de la luz”). Entre los diferentes pigmentos que promueven las respuestas morfogénicas en las plantas, los más importantes son aquellos que absorben la luz del rojo y del azul. El fitocromo es la proteína pigmento encargada de absorber la luz mayoritariamente del rojo y del rojo lejano, y en menor medida la del azul (Butler et al 1959). Por lo tanto la desetiación de las plántulas implica, entre otras cosas, interacciones antagónicas y sinérgicas con los fotorreceptores.

Por convenio, las secuencias del fitocromo de las plantas superiores se nombran de acuerdo con su homología con los genes *PHY* de *Arabidopsis*. Las monocotiledóneas parecen tener representantes únicamente de las familias *PHYA*, *PHYB* y *PHYC*, mientras que las dicotiledóneas tienen otros derivados por duplicación génica (Sharrock 1997). Los fitocromos *PHYC*, *PHYD* y *PHYE* parecen tener funciones mayoritariamente redundantes con las de *PHYA* y *PHYB*. Mientras que *PHYB* parece estar implicado en todos los estados del desarrollo, las

funciones de los otros fitocromos están restringidas a respuestas más específicas (Quail et al 1995, Whitelam 1997). La luz continua del rojo absorbida por PHYB estimula la desetiación; la luz continua del rojo lejano estimula la desetiación cuando es absorbida por el sistema PHYA. Una plántula emergente bajo la sombra de las plantas del entorno, enriquecida en luz del rojo lejano, inicia la desetiación principalmente por el sistema PHYA, que será sustituido por PHYB liberando la inhibición del crecimiento y elongando el tallo (Quail et al 1995).

El establecimiento de la fotomorfogénesis por la luz implica alteraciones a largo plazo en el metabolismo que sólo pueden tener lugar a través de cambios en la expresión génica. La estimulación y represión de la transcripción es muy rápida, por lo que está regulada por la activación directa de factores de transcripción en una o más rutas de transducción de señal iniciadas en el fitocromo (Devlin et al 2003, Salter et al 2003).

La luz azul no inhibe la elongación del hipocotilo en el mutante *hy4* de *Arabidopsis*. El aislamiento del gen *HY4* mostró que dicho gen codifica una proteína de 75 KDa con una homología de secuencia significativa con una fotoliasa de DNA bacteriana, una enzima activada por la luz azul que repara, en el DNA, dímeros de piridina formados como consecuencia de una exposición a radiación ultravioleta (Ahmad and Cashmore 1993). Debido a esta similitud de secuencias, la proteína HY4, posteriormente denominada criptocromo 1 (CRY1), se propuso como el fotorreceptor de la luz azul que media la inhibición de la elongación del tallo. En *Arabidopsis* se ha aislado un segundo producto

16

génico homólogo a CRY1, llamado CRY2 (Lin 2000). Las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen que codifica CRY2 muestran un ligero aumento en la inhibición de la elongación del hipocotilo, indicando, que a diferencia de CRY1, CRY2 no tiene una función principal en la inhibición de la elongación del tallo. Por otro lado, las plantas que sobreexpresan CRY2 muestran un incremento en la expansión de los cotiledones estimulado por la luz azul.

Aunque algunas de las rutas de señalización que actúan tempranamente son específicas de *PHYA* o *PHYB*, es evidente que las rutas de señalización que actúan aguas abajo deben ser comunes a múltiples fotorreceptores porque diferentes calidades de la luz pueden desencadenar la misma respuesta (Chory and Wu 2001). Por ejemplo, *SPA1* (SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A1) actúa como represor de la fotomorfogénesis dependiente de la luz en plántulas de *Arabidopsis* (Hoecker and Quail 2001). La proteína SPA1 tiene un dominio proteico superhélice que le permite interactuar con el factor COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1), una E3 ubiquitina ligasa que induce la degradación proteolítica de factores que promueven este programa de desarrollo cuando la plántula no detecta la presencia de luz (Ma et al 2002). La interacción inducida por la luz de SPA1 con CRY2 inhibe la interacción entre SPA1 y COP1 y, por tanto, la actividad del complejo E3 ligasa (Fankhauser and Ulm 2011). Diversos análisis genéticos han demostrado que la fotomorfogénesis es el programa de desarrollo por defecto tras la germinación, y que se mantiene reprimido principalmente gracias a la acción de COP1 que actúa aguas abajo de fitocromos y criptocromos. En presencia de luz,

COP1 abandona el núcleo y es inactivado, contribuyendo así al desarrollo fotomorfológico (Deng et al 1991, von Arnim and Deng 1994).

Los organismos están sometidos a ciclos diarios de luz y oscuridad y muestran un comportamiento rítmico asociado a dichos cambios. Algunos ejemplos de estos ritmos son los movimientos de las hojas y pétalos, patrones de crecimiento o la capacidad fotosintética (Harmer 2009). Cuando los organismos pasan de ciclos diarios de luz-oscuridad a oscuridad continua (o luz débil continua), muchos de estos ritmos continúan teniendo lugar, incluso durante varios días. El periodo de ritmo es de unas 24 h, por lo que se denomina ritmo circadiano (del latín “*circa diem*”, que significa “aproximadamente un día”). La naturaleza endógena de los ritmos circadianos implica que están controlados por un oscilador interno acoplado a una gran variedad de procesos fisiológicos. Este oscilador interno depende de la luz, y compensa fluctuaciones en la temperatura, por lo que puede actuar al margen de estaciones y condiciones climáticas (Gould et al 2006). Los ritmos generados por el reloj circadiano pueden distinguirse de los que se producen en respuesta directa a las señales del entorno, ya que los ritmos circadianos persisten cuando las plantas son transferidas a condiciones ambientales constantes o a condiciones de oscuridad o luz constantes (de Montaigu et al 2010).

Los tres genes que se asociaron inicialmente al oscilador en *Arabidopsis* son: *TOC1* (TIMING OF CAB EXPRESSION 1), *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) y *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) (de Montaigu et al 2010). Los productos

18

proteicos de estos genes actúan de manera conjunta: *TOC1* reprime la expresión de los genes *LHY* y *CCA1* por la noche, y un aumento de éstos últimos reprime la expresión de *TOC1* por el día. *TOC1* alcanza su máximo al final del día, cuando *LHY* y *CCA1* están en sus mínimos (Hsu and Harmer 2014). Las dos proteínas reguladoras MYB (*LHY* y *CCA1*), además de funcionar como componentes del oscilador, regulan la expresión de los genes que se expresan por la mañana, como *LHCB* (LIGHT HARVESTING COMPLEX A/B BINDING), y reprimen la expresión de genes que se expresan por la noche (Hsu and Harmer 2014). De los cinco fitocromos de *Arabidopsis*, todos excepto el fitocromo C han sido implicados en la sincronización del reloj. Cada uno de ellos actúa como un fotorreceptor específico para la luz del rojo, del rojo lejano o del azul. Por otro lado, las proteínas *CRY1* y *CRY2* participan en la sincronización del reloj a la luz azul, del mismo modo que lo hacen en insectos y mamíferos (Devlin and Kay 2000).

Además de por la luz, la decisión de seguir un desarrollo escotomorfogénico o fotomorfogénico está estrictamente regulada por hormonas. En concreto hay evidencia para la implicación de los brasinosteroides (BRs), las citocininas (Cq), las auxinas (Aux), el etileno y las giberelinas (GAs). Por ejemplo, la deficiencia en BRs o en GAs provoca que las plantas tengan un aspecto desetioloado característico de la fotomorfogénesis cuando son cultivadas en la oscuridad (Alabadi et al 2004, Li et al 1996); en concreto, la deficiencia en la síntesis de GAs favorece la transición entre los dos tipos de desarrollo, fomentando un desarrollo fotomorfogénico en el que se activa la expresión de los genes implicados en la utilización energética

de la luz y en la protección frente a la irradiación, entre otros (Alabadi et al 2004).

1.3 Giberelinas

El crecimiento y desarrollo vegetal están regulados por varios tipos de fitohormonas que actúan de forma conjunta e individual. Las GAs fueron las segundas hormonas que se caracterizaron después de las auxinas, a mediados de los años 50 (Phinney 1956, Phinney et al 1957), y a diferencia de éstas, las GAs se caracterizaron más por su estructura química que por su función fisiológica, ya que tienen efectos similares en su aplicación en plantas y hongos (Akira Kawarada 1955). En la actualidad, se han identificado más de 126 GAs, la mayoría inactivas, que actúan como intermediarios metabólicos de las GAs activas GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ (Zi et al 2014). Aunque inicialmente las GAs se asociaron a la promoción de procesos que implican elongación, en los últimos años se han descrito como fundamentales en muchos procesos biológicos a lo largo de todo el desarrollo de la planta (Sun 2010). La biosíntesis de estas hormonas está sujeta a un estricto control tanto genético como del entorno en el que se desarrolla el organismo en cuestión.

1.3.1 Biosíntesis de giberelinas:

Las GAs constituyen una gran familia de diterpenos que son sintetizados en una ramificación de la ruta terpenoide (Figura 3). Los

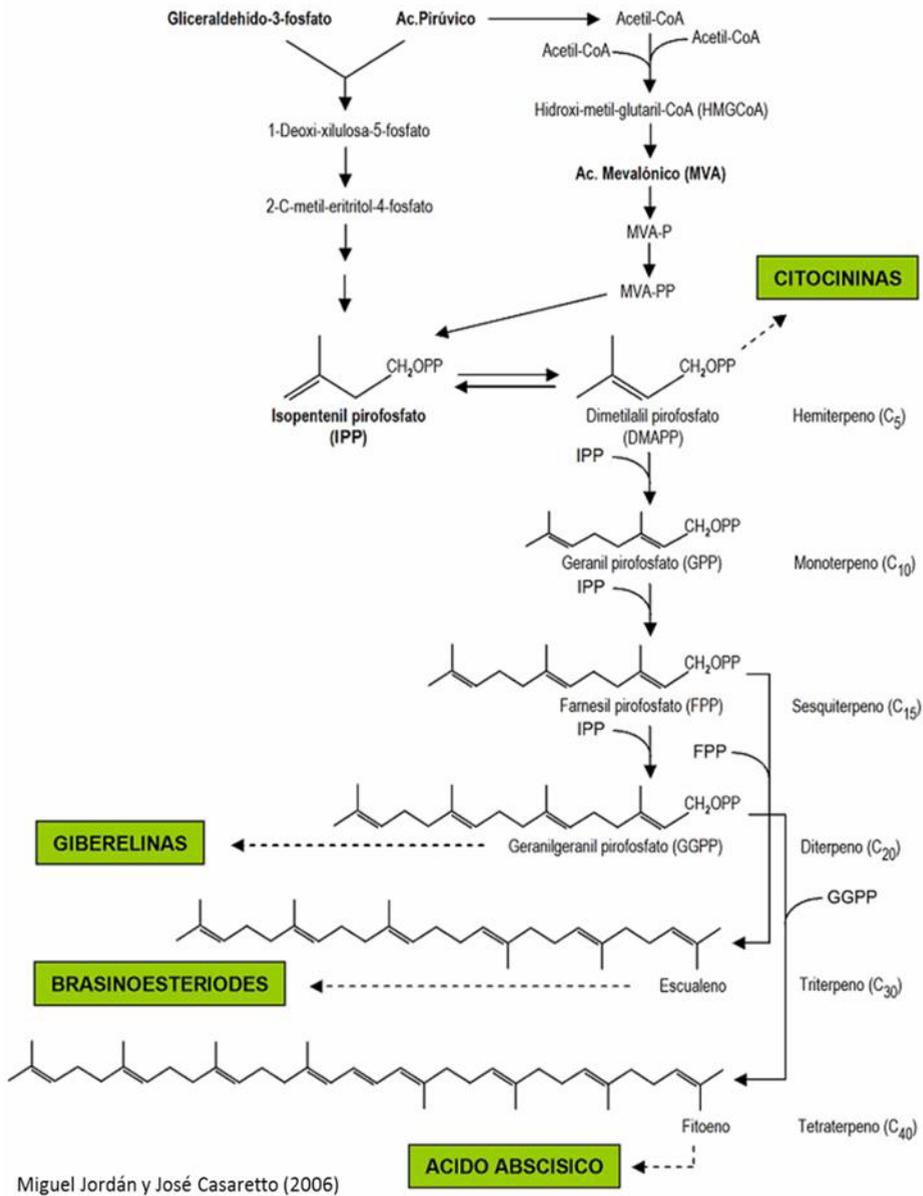


Figura 3. Vía de biosíntesis de terpenos. Se muestran las dos rutas para la síntesis del IPP: a partir de glicerilaldehído-3-fosfato y piruvato (en cloroplastos) y la ruta del mevalonato (citosólica). Distintos precursores terpenoides dan origen a citocininas, giberelinas, brasinoesteroides y ácido abscísico.

terpenos son metabolitos secundarios vegetales insolubles en agua y biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicolíticos. Los elementos estructurales de los terpenos son unidades de isopreno por lo que también se los conoce como *isoprenoides*.

Existen dos vías para la biosíntesis de los terpenos: la ruta del ácido mevalónico que tiene lugar en el citosol y la ruta del fosfato de metileritriol (MEP) que funciona en cloroplastos y otros plastos. El intermediario clave para las dos rutas es el isopentenil difosfato (IPP) o pirofosfato de isopentenilo que se combina con el dimetilalil difosfato (DMAPP) para formar moléculas mayores (Lichtenthaler 1999). Las GAs son terpenoides tetracíclicos formados por cuatro unidades de isopreno (Kobayashi et al 1996).

Las plantas contienen una gran cantidad de GAs, aunque la mayoría de ellas son metabolitos intermediarios biológicamente inactivos o productos de inactivación de las GAs activas, que son minoritarias. Actualmente se conocen todas las enzimas de la ruta de biosíntesis de las GAs y se han caracterizado muchos de los genes de estas enzimas (Hedden and Phillips 2000, Pearce et al 2015) (Figura 4).

Los puntos clave de la regulación son las enzimas biosintéticas GA20-oxidasa (GA20ox) (Lange et al 1994), y GA3-oxidasa (GA3ox) (Williams et al 1998), y una enzima implicada en el metabolismo de las GAs, la GA2-oxidasa (GA2ox) (Thomas et al 1999). La transcripción de los genes de las tres enzimas está estrictamente regulada y presentan secuencias comunes de unión del 2-oxoglutarato y del Fe^{2+} .

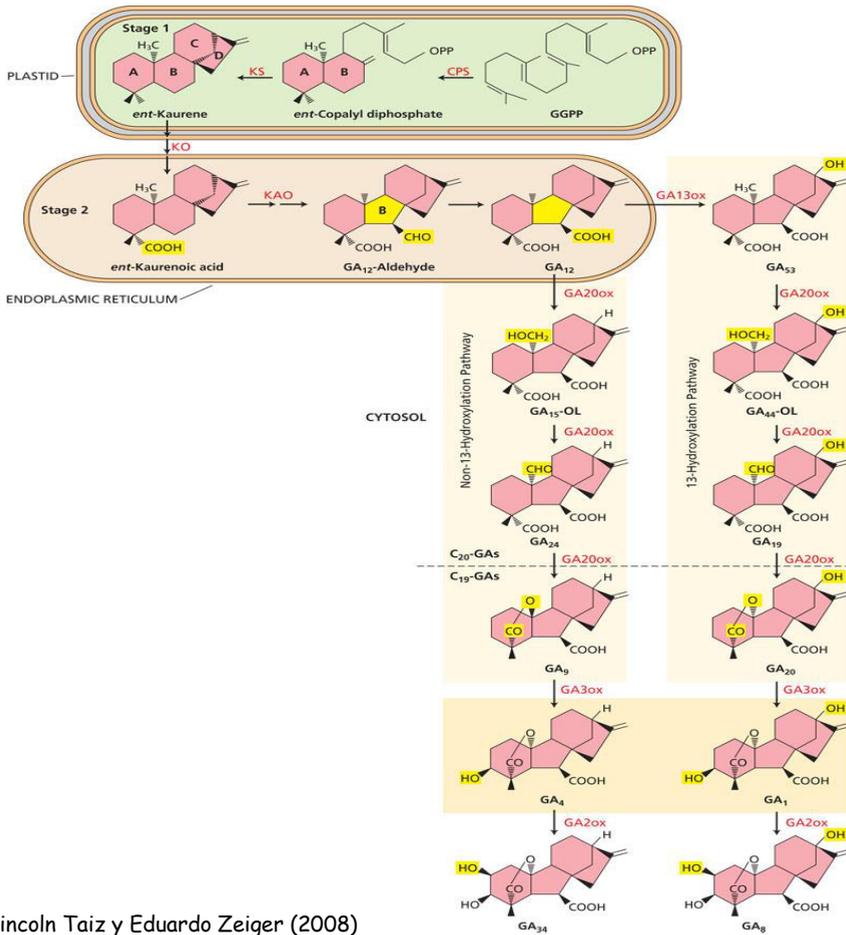


Figura 4. Ruta de biosíntesis de GAs. En la etapa 1, el GGPP es convertido en ent-kaureno a través de la CPP en los plastos. En la etapa 2, en el retículo endoplásmico, el ent-kaureno es convertido a GA₁₂ o a GA₅₃, dependiendo de la hidroxilación de GA en el carbono 13. En la etapa 3 en el citosol, GA₁₂ y GA₅₃ son convertidas en las diferentes GAs.

1.3.2 Regulación del metabolismo de giberelinas:

Como las GAs están implicadas en muchas etapas del desarrollo de la planta, sus funciones están estrictamente asociadas a la regulación de su metabolismo por múltiples factores ambientales y endógenos, de

tal modo que la mayor parte de esta regulación se ejerce a través del control transcripcional. La homeostasis de GAs se consigue a través de mecanismos de retroalimentación que actúan principalmente sobre *GA20ox*, *GA3ox* y los genes *GA2ox* (Hedden and Phillips 2000, Yamaguchi 2008) (Figura 5). Por ejemplo, la aplicación de GAs provoca una reducción de los genes biosintéticos (*GA20ox* y *GA3ox*) y un aumento de la transcripción de los genes encargados de la degradación (*GA2ox*) (Elliott 2001, Hedden and Phillips 2000, Lester et al 1999).

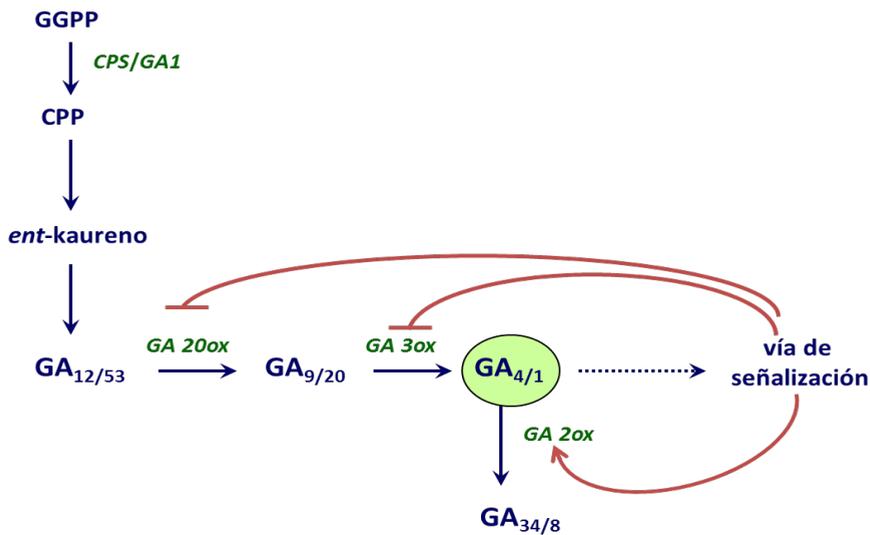


Figura 5. Esquema simplificado de la homeostasis de GAs. Un aumento de los niveles de GAs inhibe la transcripción de los genes que codifican GA20ox y GA3ox, y activan la transcripción de GA2ox, encargada de la degradación de la forma activa de GA.

Aunque las GAs activas están libres, muchas veces se encuentran unidas covalentemente a azúcares, sobre todo en algunas semillas. Esta glucosilación es, en cierta medida, un mecanismo de

inactivación; ya que pueden metabolizarse los glucósidos a GAs libres constituyendo una reserva de GAs para la semilla (Figura 6) (Schneider and Schmidt 1990).

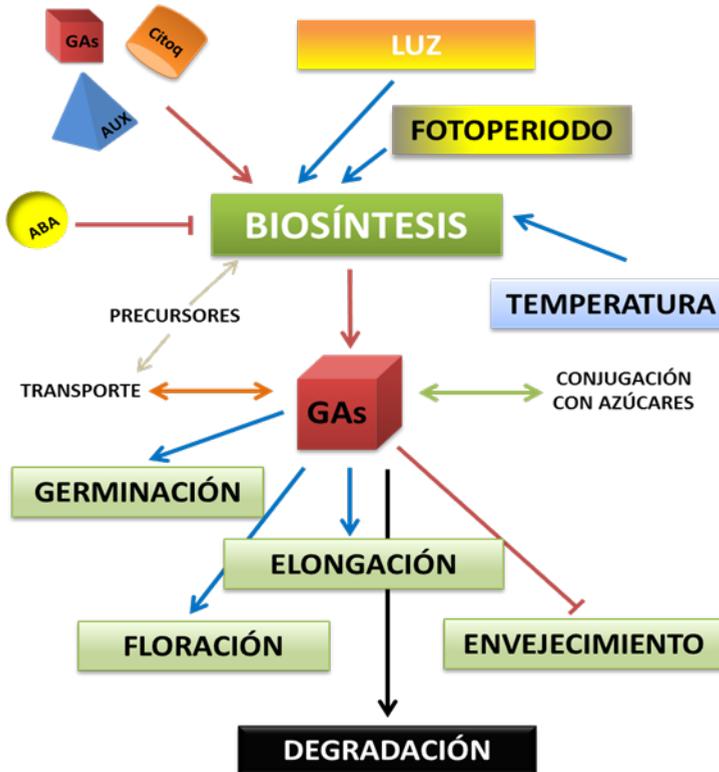


Figura 6. Esquema simplificado de los mecanismos fisiológicos de las GAs. Se muestran los factores ambientales y moléculas que participan en su biosíntesis y las funciones fisiológicas de las GAs hasta su degradación en las células vegetales.

Las semillas inmaduras y los frutos en desarrollo son los que contienen niveles más altos de GAs. Las GAs que se sintetizan en el ápice son transportadas a través del floema junto con los intermediarios de su biosíntesis a los distintos órganos de destino donde tiene lugar su

completa conversión a moléculas activas (GA1 y GA4). Las GAs sintetizadas en raíces son transportadas al ápice a través del xilema (Elliott 2001).

Las GAs son muy importantes como mensajeros de los estímulos ambientales para la planta. Factores como la luz y la temperatura alteran los niveles de GAs activas mediante la alteración de la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis (Yamaguchi and Kamiya 2000). Algunas semillas sólo son capaces de germinar en presencia de luz por lo que se puede forzar su germinación en oscuridad mediante la aplicación de GAs. Se ha demostrado que esta promoción de la germinación es consecuencia de un aumento en la transcripción del gen de la GA3ox inducida por la luz, que convierte GA9 y GA20 en GA4 y GA1, respectivamente, que son las formas activas de las GAs (Toyomasu et al 1998). En el proceso de desetiolación, el tallo reduce su elongación debido a cambios en la percepción de GA1, ya que los niveles de esta molécula están aumentados durante esta etapa del desarrollo (Garcia-Martinez and Gil 2001). Del mismo modo, la biosíntesis de GAs está regulada por el fotoperiodo, ya que en plantas que sólo florecen en días largos se puede inducir la floración mediante aplicación de GAs exógenas (Blazquez and Weigel 2000, Zanewich and Rood 1995). En asociación con fitocromos, cumplen un papel en la inducción de la floración; en particular, aunque de manera no conocida, iniciando señales en genes meristemáticos del tipo AGAMOUS vinculados a la diferenciación de estructuras florales tales como pétalos, estambres o carpelos (Yu et al 2004).

En el caso de la temperatura, hay muchas semillas que requieren pasar por un proceso de *estratificación* para romper el mecanismo de dormancia y germinar, y algunas plantas necesitan *vernalización* para florecer. En ausencia de frío, el ácido *ent*-kaurénico se acumula a niveles altos en el ápice del tallo donde se percibe el frío. Al poner las plantas a bajas temperaturas, el ácido se convierte en GA9, la GA que estimula la floración (Hazebroek and Metzger 1990). En general, en algunas especies de desarrollo invernal o en algunas plantas bienales, las GAs inducen el entallamiento, la floración o ambos procesos, sin necesidad de que la planta tenga que pasar por un período de frío.

Los rápidos cambios en la actividad transcripcional de genes metabólicos clave en ciertas vías de hormonas pueden ser una estrategia general por la que la temperatura modula la tasa de crecimiento del hipocotilo o del tallo. La localización espacial del control de la transcripción de genes de las hormonas se produce en las regiones que son fuentes naturales para la síntesis de hormonas o el tejido que responde a hormonas como la parte superior del hipocotilo (Stavang et al 2009). En *Arabidopsis* se ha visto que por una parte, la temperatura promueve la actividad del factor de transcripción PIF4 a nivel transcripcional como una respuesta temprana y directa a esta señal del medio ambiente, independientemente de la homeostasis hormonal de la plántula (Stavang et al 2009); y por otro lado, la temperatura podría actuar a nivel post-traducciona l a través de la activación transcripcional de la vía de GAs, evitando la inhibición de las proteínas DELLA sobre la unión de PIF4 al DNA (de Lucas et al 2008).

1.3.3 Señalización por giberelinas:

De la misma manera que se han podido determinar los componentes de la ruta del metabolismo de las GAs, los análisis genéticos en *Arabidopsis* y arroz, han permitido definir los elementos que intervienen en la ruta de señalización de GAs. En esencia, los componentes fundamentales de la vía de señalización son: los receptores de GAs *GID1* (Ueguchi-Tanaka et al 2005), las proteínas reguladoras *DELLA* (Peng et al 1997) y la proteína f-box *SLY1* (McGinnis et al 2003).

Se han identificado en *Arabidopsis* dos tipos de mutantes de la vía de señalización de GAs en función del fenotipo que presentan (Sun 2000, Thornton et al 1999): mutantes enanos (*dwarf*), que son deficientes en la vía de señalización de GAs y pueden responder o no a la aplicación exógena de estas hormonas dependiendo de si la mutación se encuentra en la biosíntesis de GAs o en alguno de los elementos que actúan aguas abajo. Y mutantes altos (*slender*), que son alelos nulos deficientes en reguladores negativos de la vía y exhiben un fenotipo similar al silvestre tratado con GAs.

Las proteínas *DELLA* que pertenecen a la familia GRAS de factores de transcripción (Pysh et al 1999), son los reguladores que reprimen la señalización por GAs: la interacción de las GAs con los receptores *GID1* permite la unión a las *DELLA*, promoviendo su degradación y por tanto la activación de la ruta. La estructura de estas proteínas tiene regiones altamente conservadas de localización nuclear y está compuesta de una región GRAS en el dominio C-terminal común

a todas las proteínas de esta familia, y un dominio DELLA (aminoácidos Asp, Glu, Leu, Leu y Ala) en el dominio N-terminal (Figura 7).

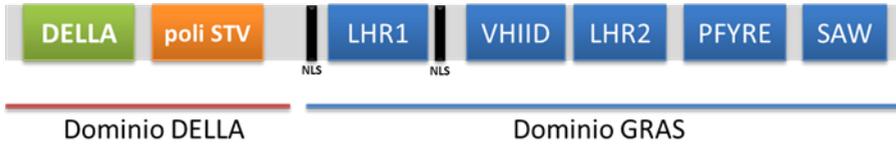


Figura 7. Representación esquemática de las proteínas DELLA. El dominio DELLA se sitúa en el extremo N-terminal. Las secuencias de localización nuclear se localizan en la región GRAS, en el extremo C-terminal.

En *Arabidopsis thaliana*, la familia DELLA está constituida por 5 miembros: GAI (GA INSENSITIVE) (Peng et al 1997), RGA (REPRESSOR OF ga1-3) (Silverstone et al 1998), RGL1, RGL2 y RGL3 (RGA LIKE) (Richards et al 2000).

Las plantas de *Arabidopsis* con ciertos alelos de alguna de las 5 proteínas DELLA (alelos *gai-1* (Koornneef et al 1985) y *rga-Δ17* (Dill et al 2001)) muestran un fenotipo dominante equivalente al observado en condiciones de deficiencia en GAs, que no puede ser complementado con la aplicación exógena de estas hormonas: la delección de 17 aminoácidos, incluyendo el motivo DELLA altamente conservado, conlleva que estos mutantes se comporten como represores constitutivos de la señalización por GAs, ya que no pueden interactuar con el receptor ni en presencia de la hormona (Murase et al 2008, Peng et al 1997). RGA y GAI, con un 82% de homología (Dill and Sun 2001), tienen funciones particularmente redundantes si atendemos a la regulación del crecimiento por GAs, por ejemplo;

aunque parece que RGA tiene una función más dominante que GAI, ya que el mutante deficiente en GAs *gai-t6* (Peng et al 1997) no restablece el crecimiento del mutante *ga-1* deficiente en la síntesis de GAs, mientras que un mutante equivalente en *rga* (*rga-24* (Silverstone et al 1998)) sí es capaz de hacerlo (Alabadi et al 2004) (Figura 8).

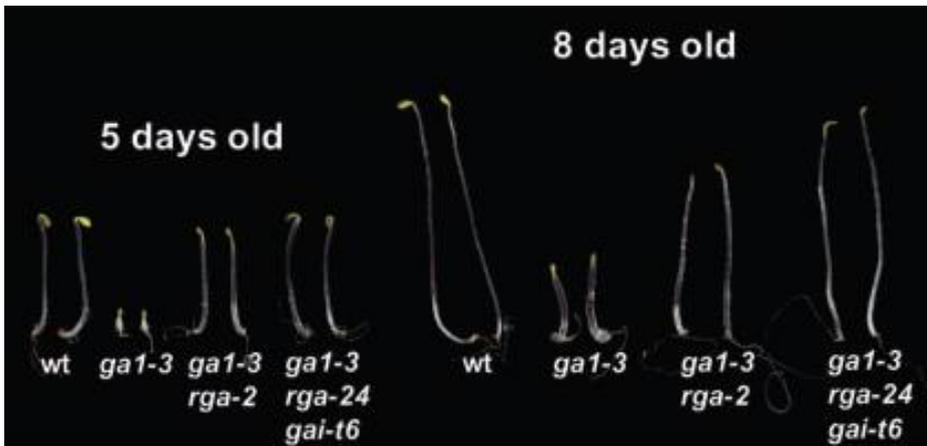


Figura 8. Efecto de la biosíntesis y señalización de GAs en mutantes fotomorfológicos de *Arabidopsis* en oscuridad. Se observa en los fenotipos representativos (5 y 8 días tras la germinación) cultivados en oscuridad, cómo se restablece parcialmente el crecimiento del mutante *ga1-3* mediante la mutación en el locus de RGA (Alabadi et al 2004).

La degradación de las proteínas DELLA, inducida por las GAs, depende de la interacción de estas proteínas con el complejo SCF a través de la F-box SLY-1 (SLEEPY 1) (Dill et al 2004). Este complejo ubiquitina a las proteínas DELLA para que sean degradadas por el proteasoma. La delección de 17 aminoácidos en la región N-terminal de las proteínas DELLA, incluyendo la región DELLA, impide su unión a GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1), el receptor de GAs, por lo que la

unión al complejo SCF no tiene lugar y las proteínas DELLA no son degradadas (Dill et al 2001, Fu et al 2004).

La clonación de GAI en *Arabidopsis* ha permitido identificar los ortólogos de las DELLA en otras especies. De este modo, se ha descrito que las mutaciones *la cry* en guisante, *slender* en arroz, *slender1* en cebada o *procera* en tomate afectan a los genes DELLA de estas especies (Chandler 1988, Ikeda et al 2001, Jasinski et al 2008, Weston et al 2008). También se demostró que las variedades de la “revolución verde” introducidas entre los años 60’ y 70’, que además de ser enanas tenían una producción mayor, tenían lesiones moleculares en uno de los dos genes DELLA de trigo, *Rht-1* (Peng et al 1999), similares a la que se encuentran en el mutante *gai1* de *Arabidopsis*. Mutaciones similares se han descrito en el mutante enano *d8* de maíz (Peng et al 1999) y en la variedad *Pinot Meunier* de vid (Boss and Thomas 2002).

En *Arabidopsis thaliana*, la represión de la fotomorfogénesis se lleva a cabo a través de la acción conjunta del signalosoma COP9 y las proteínas COP1, COP10 y DET1, que permanece inactivo cuando la planta crece en presencia de luz (Ma et al 2002). El papel represor de las GAs sobre la fotomorfogénesis se basa en la observación de que la reducción de la síntesis de GAs mediante la aplicación del inhibidor paclobutrazol (PAC, inhibe la formación de *ent*-kaureno), o el bloqueo de la acción de las GAs mediante mutaciones estabilizadoras en las proteínas DELLA, provocan una desetiación parcial en la oscuridad (Alabadi et al 2004). De este modo, las GAs actúan sobre las plántulas de *Arabidopsis* de dos formas: promoviendo el desarrollo escotomorfogénico como la elongación del hipocotilo y el

mantenimiento del gancho apical, y reprimiendo la fotomorfogénesis en la oscuridad mediante la regulación de la expresión de los genes que se inducen por la presencia de la luz, como *CAB2* y *RbcS*, entre otros.

Los análisis moleculares realizados hasta la fecha en *Arabidopsis thaliana* han generado un modelo de regulación de la fotomorfogénesis por GAs (Figura 9), en el que la señalización por estas hormonas, a través de las proteínas DELLA, está modulada al menos en dos puntos: la regulación de la concentración de HY5 (LONG HYPOCOTYL 5) y la regulación de la actividad de los elementos PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) (Alabadi et al 2008).

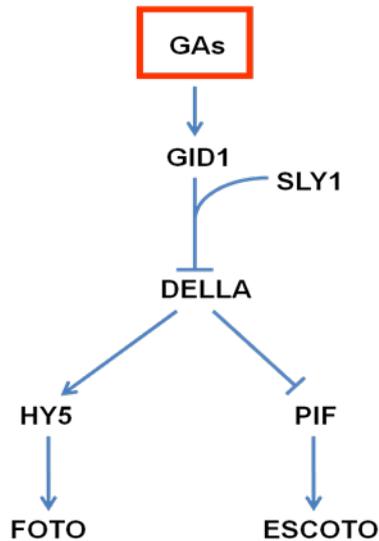


Figura 9. Esquema simplificado de la señalización por GAs. Las GAs inducen la formación del complejo ternario DELLA-SLY-GID para la degradación de las proteínas DELLA. Estas proteínas inhiben la transcripción de elementos *PIF* e inducen la transcripción de *HY5*, por lo que su presencia promueve el desarrollo fotomorfogénico.

HY5 es un factor de transcripción de tipo *bZIP* que siempre se localiza en el núcleo, responsable de promover la fotomorfogénesis (Yadav et al 2002). Se une al motivo caja G de múltiples promotores inducibles por la luz y es necesario para la expresión óptima de los correspondientes genes. COP1 promueve su degradación en la oscuridad y juega un papel muy importante, por ejemplo, en la acumulación de antocianinas en presencia de luz.

Los factores de transcripción PIF pertenecen a la familia bHLH e interaccionan con el extremo C-terminal de los fotorreceptores PHYA y PHYB, actuando como reguladores negativos de la señalización de PHYB. PIF3 se asemeja a los factores de transcripción que se unen al motivo G de los promotores vegetales y proporciona a los genes una regulación por la luz (Jeong and Choi 2013, Quail 2000).

La vía de GAs promueve el crecimiento de las plántulas crecidas en la oscuridad mediante la prevención de la acumulación de una forma inactiva de las proteínas PIF, un mecanismo que es intrínsecamente diferente de la acumulación de HY5 dependiente de estas hormonas (Alabadi et al 2008). El mecanismo propuesto para esta función tiene lugar a través de la inhibición de la actividad de los factores de transcripción de la familia PIF, y de la estabilización de la proteína HY5 en la oscuridad (Alabadi et al 2008), inclinando la elección hacia el programa fotomorfogénico incluso en ausencia de luz (Figura 10).

El objetivo principal de esta tesis es entender mejor los elementos que intervienen en la regulación de la transición entre la escotomorfogénesis y la fotomorfogénesis, explorando la variación

existente en las distintas poblaciones de *Arabidopsis*. Esta variación, muy notable a nivel fenotípico, puede estar presente también en los mecanismos moleculares responsables de la transición fotomorfogénica, tanto en los elementos que ya se sabe que intervienen en ella como en otras posibles interacciones.

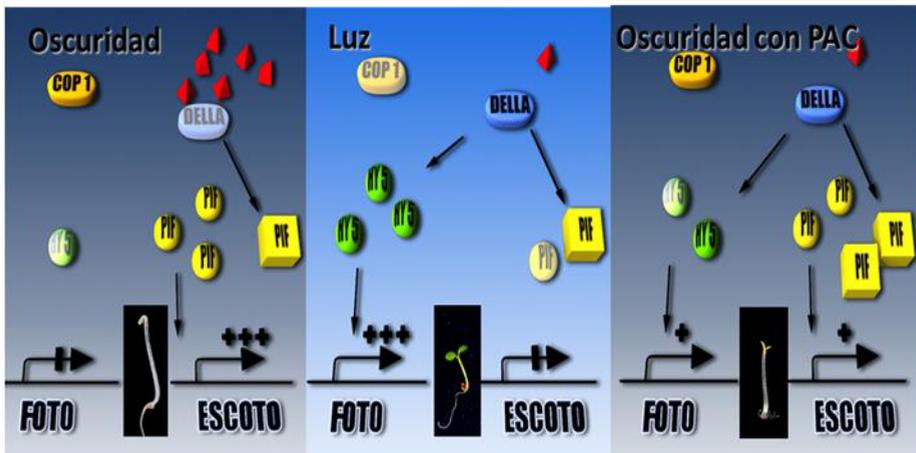


Figura 10. Regulación de la fotomorfogénesis por GAs. A. Después de la germinación en ausencia de luz, COP1 es muy activo y promueve la degradación de los factores que inducen la fotomorfogénesis, como HY5. Por otro lado, COP1 induce la acumulación de proteínas PIF activas responsables del crecimiento etiolado. Los altos niveles de GAs provocan un descenso en la acumulación de las proteínas DELLA, lo que conlleva la prevención de su efecto negativo sobre la actividad de las proteínas PIF y de su efecto positivo en la acumulación de HY5. **B.** En la transición a la luz, los niveles de GAs descienden y no inhiben a las proteínas DELLA, promoviendo una acumulación de HY5, un descenso en los niveles de las proteínas PIF y, por tanto, un desarrollo desetiolado o fotomorfogénico. **C.** Cuando las plántulas son tratadas con PAC se produce una desetiolación parcial en oscuridad.

1.3.4 Interacción de las giberelinas con otras hormonas:

Las hormonas actúan en la planta de forma aislada, pero en mayor medida es la acción conjunta de varios tipos de hormonas lo que lleva a la planta a completar su desarrollo. Las hormonas pueden influir en la acción de otras hormonas, a veces interviniendo en su biosíntesis. En el caso de las GAs, su síntesis está sujeta a la acción de varias hormonas como las Aux, las Cq y el ABA.

Las Aux regulan de forma específica la expresión de dos genes de la biosíntesis de GAs (*AtGA20ox1* y *AtGA20ox2*) que codifican dos enzimas que participan en pasos limitantes, de tal forma que estas hormonas promueven de manera general la biosíntesis de GAs (Frigerio et al 2006).

A nivel de entrenudos, en el meristemo intercalar de arroz las GAs actúan como reguladoras del ciclo celular. En este sistema, estas hormonas incrementan la expresión de genes de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) esenciales para entrar en mitosis, en primer lugar los que regulan la entrada en fase S y en segundo lugar los que controlan la entrada en fase M. En el caso del arroz, que crece parcialmente sumergido en agua, las condiciones de anoxia incrementan el contenido de etileno, que, a su vez, reduce el nivel endógeno de otra hormona, el ácido abscísico (ABA) que actúa como antagonista de las GAs. Al reducir el nivel de ABA, la acción de las GAs endógenas es más intensa sobre el crecimiento (Fabian et al 2000).

En *Arabidopsis thaliana*, se ha visto que las GAs regulan el desarrollo del gancho apical de las plántulas cultivadas en oscuridad

mediante la regulación transcripcional de las vías de señalización de las Aux y del etileno (Gallego-Bartolome et al 2011b).

También en *Arabidopsis* se ha descrito la interacción entre GAs y BRs en el control de numerosos procesos fisiológicos como la elongación del hipocotilo o la germinación (Bai et al 2012), así como en la represión de la fotomorfogénesis en la oscuridad (Alabadi et al 2004, Gallego-Bartolome et al 2012), donde los BRs median el control de las GAs sobre la expresión de CAB2 y RbcS.

1.4 Variación natural

La variación natural es una variación intraespecífica causada por mutaciones que pueden constituir una ventaja adaptativa y que por tanto se mantiene a lo largo de la evolución de la especie. Los estudios de la variación natural en los organismos modelo constituyen un puente entre los análisis moleculares de la función génica y las investigaciones de adaptación y selección natural. Muchas vías genéticas están conservadas entre especies y dentro de la misma especie, pero pueden ser susceptibles de cambios a medida que el organismo se adapta a su entorno. De este modo, el estudio de la variación natural ha servido en los últimos años para identificar los elementos que regulan una vía de señalización, permitiendo explorar la posibilidad de que una vía en concreto haya estado sujeta a variación con fines adaptativos (Alonso-Blanco and Koornneef 2000, Koornneef et al 2004).

Las plantas son organismos sésiles, por lo que su adaptación al nicho en el que se encuentran puede ser más dramática desde un punto

de vista fenotípico, sufriendo cambios en su arquitectura o en el tiempo de floración (variación cuantitativa), o cambios en la interacción con otros organismos (variación cualitativa). A lo largo de la historia se han desarrollado multitud de técnicas de selección y conservación de aquellos caracteres de interés para el ser humano, tanto en especies de cultivo como en especies ornamentales. En los últimos años se ha extendido el uso de especies modelo, como *Arabidopsis*, para estudiar caracteres tanto cuantitativos como cualitativos de variación natural.

En *Arabidopsis*, el análisis de la variación natural ha contribuido a la identificación de importantes complejos génicos que han intervenido en el proceso de evolución de su genoma, en la estructura de la población y en los mecanismos de selección. Esta planta auto-compatible, tiene un ciclo de vida muy corto, de menos de dos meses, lo que ha permitido su estudio a lo largo de varias generaciones. Se encuentra de forma natural en casi todo el planeta, sobre todo en el hemisferio norte, abarcando prácticamente todos los climas y condiciones existentes y mostrando numerosos fenotipos observables a simple vista (Figura 11).

Debido a su auto-compatibilidad, las plantas de *Arabidopsis* recogidas a lo largo de todo el planeta, representan líneas puras prácticamente homocigotas. Estas líneas puras se conocen comúnmente como ecotipos, o variedades distintas de una especie, genéticamente adaptados a determinados hábitats. Sin embargo, actualmente el significado ecológico se ha perdido, por lo que se usa el término accesión, que se utiliza en las colecciones de germoplasma para

referirse a un genotipo concreto recolectado en un lugar específico (Alonso-Blanco and Koornneef 2000).

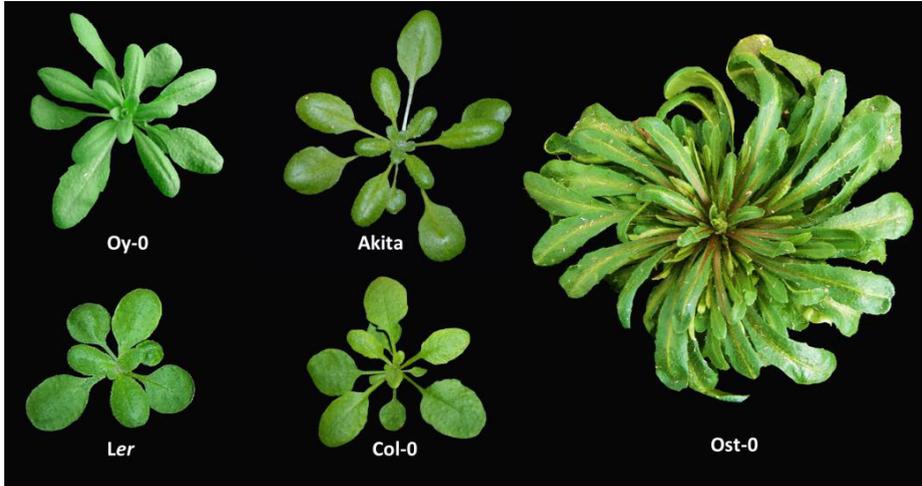


Figura 11. Accesiones de *Arabidopsis* antes de la subida a flor o *bolting*. Se observan diferencias en el número de hojas, longitud de los peciolos, densidad de tricomas o forma de la hoja. Las cinco accesiones están incluidas entre las seleccionadas para este trabajo.

El estudio de las poblaciones naturales de *Arabidopsis* o accesiones como fuente de variación genética ha hecho posible en algunos casos la determinación de los genes concretos de una ruta susceptibles de ser seleccionados por el entorno para generar cambios adaptativos en las variedades naturales (Alonso-Blanco et al 2005). La definición de las funciones génicas de una especie requiere la caracterización fenotípica de sus variantes genéticas (Alonso-Blanco and Koornneef 2000).

Muchos de los genes que actúan en una vía de señalización se han identificado gracias al uso de mutantes en *Arabidopsis*. Los análisis

moleculares indican que la mayor parte de los loci identificados implicados en el desarrollo corresponden a reguladores transcripcionales que se unen al DNA o proteínas de unión a RNA (Weigel 1995). De este modo, aunque un rasgo puede manifestar una variación fenotípica continua, la base genética de las diferencias puede deberse a la variación alélica en un único locus. Este locus es entonces un *gen candidato* para investigar dicha variación fenotípica.

Aunque gran parte de la variación se puede explicar por las diferencias entre las medias de los genotipos, siempre hay algo de variación dentro de cada genotipo, que puede ser resultado de las influencias ambientales o de la segregación de otros genes, aún no identificados (Azevêdo 1974). Los genes en segregación de un rasgo cuantitativo, denominados *loci de rasgos cuantitativos* o QTL, en la mayoría de los casos no pueden identificarse individualmente. Sin embargo, es posible localizar las regiones del genoma donde se encuentran los loci relevantes y estimar cuánta implicación tienen en la variación del fenotipo a estudio.

La detección de QTLs en pequeñas regiones del genoma requiere la existencia de loci marcadores próximos unos a otros a lo largo del cromosoma. Con la llegada de las técnicas moleculares, que hacen posible la detección de polimorfismos genéticos a nivel del DNA, se ha descubierto una gran cantidad de loci variables a lo largo de los cromosomas de todas las especies. En las distintas especies modelo se han desarrollado estos marcadores moleculares como herramientas genéticas que han permitido construir mapas físicos de sus genomas. Son especialmente útiles los polimorfismos en sitios de restricción y las

repeticiones en tándem en el DNA, ya que, al ser tan comunes, permiten que cualquier pareja de líneas seleccionadas para un carácter cuantitativo distinto, posea diferencias en dichos marcadores y que éstos estén asociados al locus implicado en el carácter.

El uso de cruces entre diferentes accesiones para realizar análisis de loci cuantitativos asociados a un carácter (análisis de QTLs) es un proceso costoso y muy tedioso, por lo que se han desarrollado diferentes líneas provenientes de cruces y retrocruces, que aíslan el locus de interés para un carácter determinado. Estas líneas pueden ser recombinantes puras (RILs), en las que la recombinación entre los cromosomas se queda fijada a lo largo de futuras generaciones; o líneas casi isogénicas (NILs) en las que todo el genoma es de un parental salvo una región más o menos grande que incluye el locus al que pertenece el carácter de interés y que proviene del otro parental (Figura 12).

Ambos tipos de líneas son homocigotas e inmortales por lo que pueden utilizarse en los laboratorios de forma indefinida para estudiar distintos caracteres. Mediante el uso de NILs es mucho más rápida y fiable la identificación de un QTL de pequeño efecto en el fenotipo, pero con menor resolución que con el uso de RILs (Keurentjes et al 2007), ya que el tamaño de la población a analizar es mucho más importante que el número de réplicas y en la NILs es imprescindible realizar varias réplicas. Dependiendo de la resolución deseada se puede reducir al mínimo el número de líneas mediante el análisis de líneas de introgresión (ILs) con grandes introgresiones.

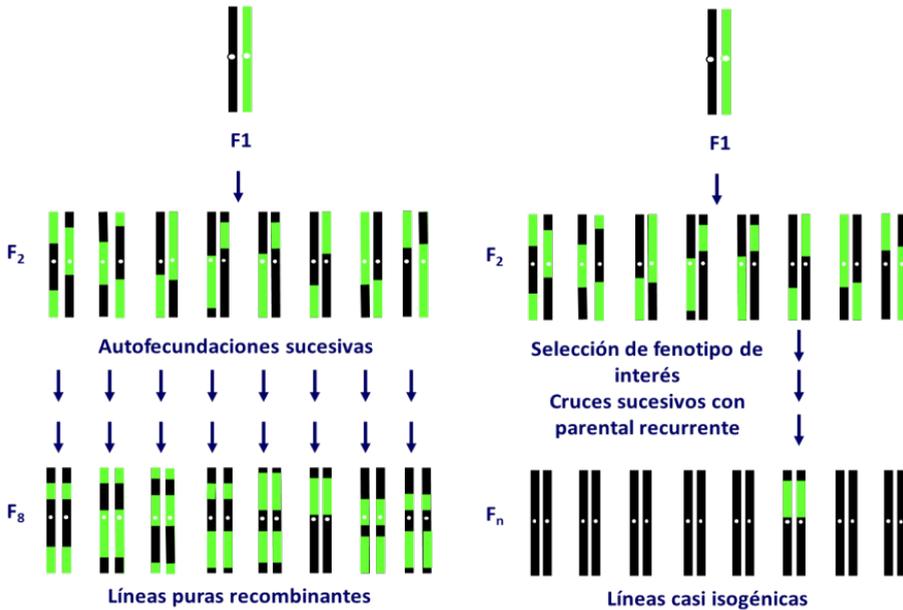


Figura 12. Generación de RILs y NILs en *Arabidopsis thaliana*. Las líneas recombinantes consanguíneas (RILs) se obtienen por el sistema de SSD (*Single Seed Descent*) mediante autofecundación de plantas individuales a partir de la F₂. Las líneas de la F₈ se consideran puras recombinantes, es decir ya no están segregando para ningún marcador. Las líneas casi isogénicas (NILs) son aquellas en las que se ha introgresado la parte del genoma del parental con el carácter de interés en el fondo genético del otro parental.

Antes de que el uso de este tipo de líneas se extendiese en los laboratorios de biotecnología vegetal, el uso de polimorfismos genéticos para detectar genes causantes de un carácter concreto estaba muy desarrollado. Esta técnica asume que el carácter a estudiar se debe a la acción de un único gen, por lo que su resolución era bastante limitada. Basándose también en la variación natural, se analizaba la secuencia del mismo gen en diferentes variedades de una misma especie. En el caso de *Arabidopsis*, los bancos de secuencias de las

diferentes accesiones, en las que se puede encontrar el genoma casi completo de algunas de ellas, facilita mucho el rastreo de polimorfismos causantes de algún cambio fenotípico, tanto en tiempo como en presupuesto. No obstante, existe un alto grado de polimorfismos entre dos accesiones distintas de *Arabidopsis*, al menos 500.000 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Fu et al 2009), por lo que es muy difícil obtener información provechosa al analizar una única región del genoma en pocas accesiones.

En la actualidad se han secuenciado más de 100 genomas de *Arabidopsis* (<http://1001genomes.org>), y muchas de estas accesiones son parentales de poblaciones de RILs disponibles para la comunidad (Ossowski et al 2008), por lo que su genoma ha ayudado a la identificación de polimorfismos responsables de QTLs (Weigel 2012).

2. Objetivos

Enmarcado en el contexto de comprender cómo las hormonas confieren plasticidad al desarrollo vegetal, el proyecto que da origen a este trabajo se centra en el estudio del control por GAs de la elección del programa de desarrollo a seguir por las plántulas recién germinadas. El objetivo final de esta línea de investigación es averiguar si la represión que ejercen las GAs sobre la fotomorfogénesis en la oscuridad tiene un valor adaptativo; es decir, si la Naturaleza ha sometido a presión selectiva a esta vía de señalización para permitir la adaptación de distintas variedades a sus nichos ambientales. En concreto, este trabajo se plantea con los objetivos siguientes:

2.1 Comprobar si existe variación natural en la sensibilidad a GAs. Esto se realiza mediante un análisis de la apertura de los cotiledones y la longitud de hipocotilo de plántulas crecidas en oscuridad y en presencia de PAC, en 150 accesiones de *A. thaliana*.

2.2 En caso de existir variación natural, estudiar la posible asociación entre el fenotipo observado y genes candidatos elegidos entre los que se conoce su participación en alguna de las etapas del desarrollo foto- y escotomorfogénico. De esta manera se podrían encontrar dianas génicas con posible valor adaptativo.

2.3 Analizar el transcriptoma de dos accesiones con comportamientos distintos en condiciones de deficiencia de GAs. E

Objetivos

identificar, en su caso, genes implicados en el proceso que sean dianas directas de las DELLA.

2.4 Realizar un análisis de QTLs entre dos accesiones con comportamientos opuestos en su sensibilidad a GAs respecto a la represión de la fotomorfogénesis en la oscuridad. Mediante este análisis se podrán identificar en el futuro nuevos *loci* implicados en la regulación del crecimiento por luz y GAs.

2.5 Rastrear una colección de factores de transcripción (TFs) de *Arabidopsis thaliana* para poder localizar otros elementos que pueden intervenir en la vía de señalización de GAs.

3. Resultados

Como se ha mencionado en la Introducción, el estudio de poblaciones naturales de *Arabidopsis* como fuente de variación genética ha dado buenos resultados en dos terrenos: la determinación de qué genes conocidos de una ruta son los preferentemente susceptibles de ser seleccionados por el entorno para provocar cambios adaptativos en las variedades naturales, y la identificación de nuevos genes que participan en una ruta de señalización.

Algunos de los fenotipos morfológicos causados por una deficiencia de GAs en oscuridad son fácilmente cuantificables, por ejemplo, la altura del hipocotilo o el ángulo entre los cotiledones (Alabadi et al 2004), y por tanto pueden ser herramientas muy útiles para determinar diferencias en la sensibilidad a GAs entre poblaciones naturales.

3.1 Efecto de la reducción de giberelinas sobre la fotomorfogénesis en poblaciones naturales.

En primer lugar estudiamos si existía variabilidad en la respuesta a GAs en poblaciones naturales de *Arabidopsis*. Para ello se ha analizado la sensibilidad a esta hormona en 150 accesiones de *Arabidopsis* (obtenidas del NASC, U. de Nottingham) estudiando la respuesta a paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la biosíntesis de GAs, de los dos caracteres arriba mencionados. Se utilizó una concentración de PAC de 1 μ M para todos los experimentos (Alabadi et al 2004).

Resultados

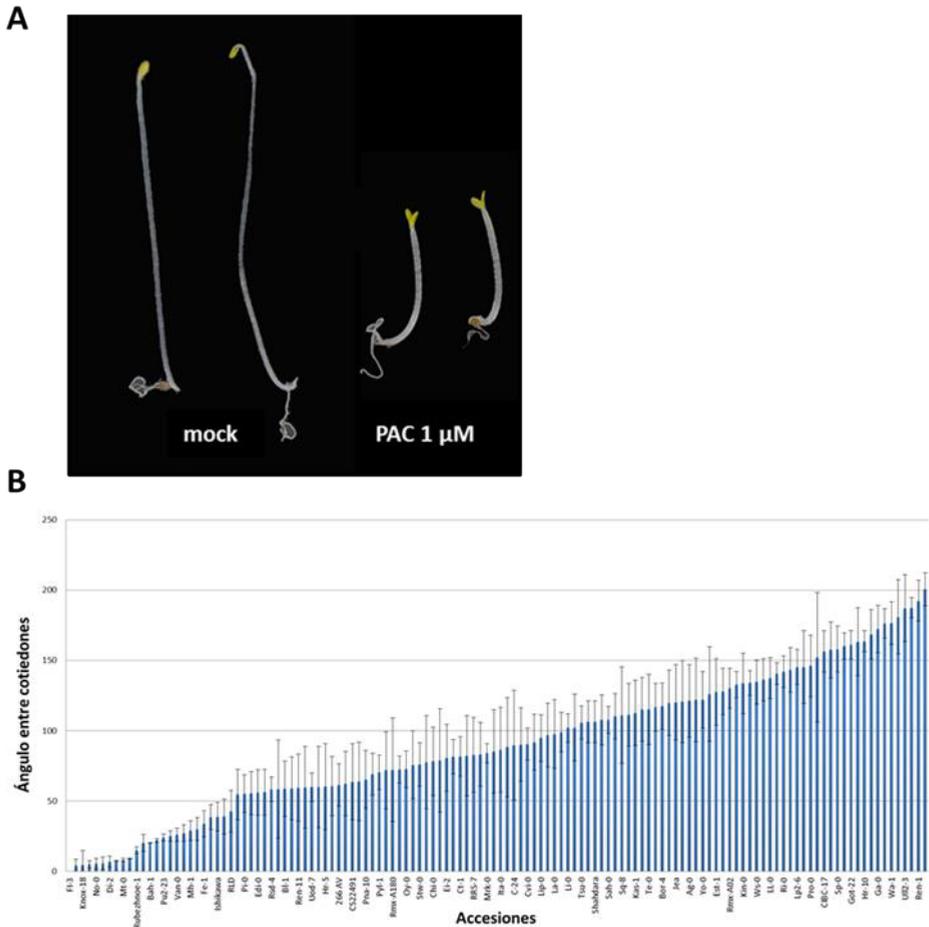


Figura 13. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad: apertura de cotiledones. A. Plántulas Col-o cultivadas en oscuridad durante 7 días en ausencia (mock) y presencia de PAC 1 μ M. **B.** Las columnas representan las medias en los ángulos de apertura de cotiledones ($n > 15$) en cada una de las 150 accesiones. Las plántulas se cultivaron en presencia de PAC 1 μ M durante 7 días en oscuridad.

Como se ve en la Figura 13B, existe una gran variabilidad en la respuesta a PAC en las distintas accesiones estudiadas, desde aquellas que mantienen los cotiledones prácticamente cerrados, hasta aquellas

que presentan una apertura muy superior a la media y que aparentemente serían hiper- e hiposensibles a GAs, respectivamente. Es importante destacar que este comportamiento sólo se observó tras el tratamiento con PAC, puesto que en las placas control todas las accesiones mostraron los cotiledones completamente cerrados (ver ejemplo en Figura 13A).

Mediante un análisis estadístico se seleccionaron aquellas accesiones cuyo comportamiento se desviaba del 5% de la distribución normal (Figura 14).

Aunque los datos obtenidos no se ajustan de manera estricta a una distribución normal (Figura 14A), asumimos que lo es al tratarse de medidas biológicas. Los valores que se desvían menos del 5% de la distribución serían los menores de 8° ($p < 0,05$) y los que tienen un ángulo mayor de 172° ($p < 0,05$). De este modo seleccionamos 21 accesiones representativas de tres grupos de comportamiento, basándonos en la apertura de cotiledones (Figura 14B): 7 que son resistentes al PAC (Akita, Knox-18, Mr-0, No-0, Bla-1, Gy-0 y Di-2), 7 que son sensibles (Ost-0, Sorbo, Wa-1, Ren-1, Ksk-1, Ga-0 y Ull2-3), y 7 con un comportamiento intermedio (Col-0, *Ler*, Cvi-0, Ei-2, Mrk-0, Oy-0 y Wt-1). Estos resultados permiten establecer que existen variedades con una sensibilidad extremadamente elevada o reducida a GAs respecto al conjunto de la población objeto de estudio, lo que confirma que el proceso analizado está sujeto a variación genética natural.

Con ensayos similares, pudimos detectar un elevado grado de variabilidad entre las distintas accesiones al medir la altura del

Resultados

hipocotilo, tanto en ausencia como en presencia de PAC (ver ejemplo en Figura 14B).

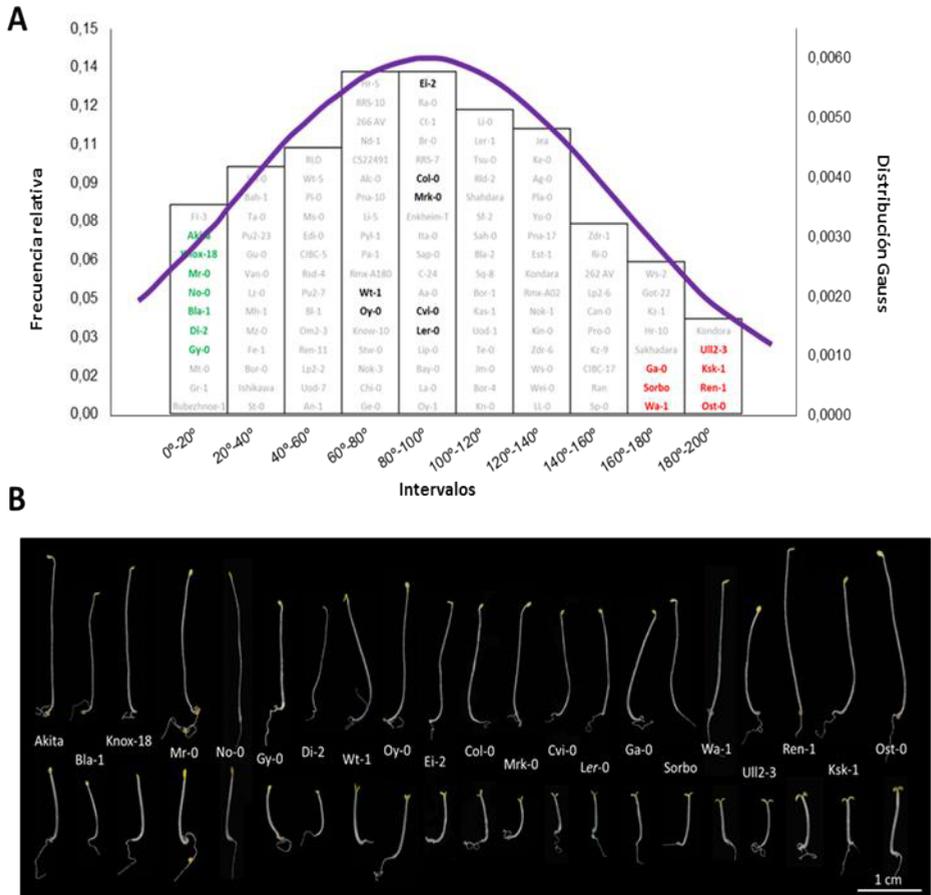


Figura 14. Selección de accesiones representativas en la apertura de cotiledones. Las plántulas se cultivaron en presencia de PAC $1 \mu\text{M}$ durante 7 días en oscuridad. **A.** Frecuencia relativa de los promedios en los ángulos de apertura de cotiledones ($n > 15$) de cada una de las accesiones. Las accesiones resistentes a PAC en color verde, las accesiones con comportamiento intermedio en negro y las accesiones más sensibles a PAC en rojo **B.** Plántulas representativas de las 21 accesiones seleccionadas por la apertura de sus cotiledones en presencia de PAC.

Si tenemos en cuenta los valores obtenidos en las 150 accesiones, se observa una ausencia de correlación ($R^2 = 0,3542$) en la reducción de la longitud del hipocotilo en plántulas crecidas en oscuridad con PAC (Figura 15A), confirmando la gran variabilidad en la sensibilidad al inhibidor.

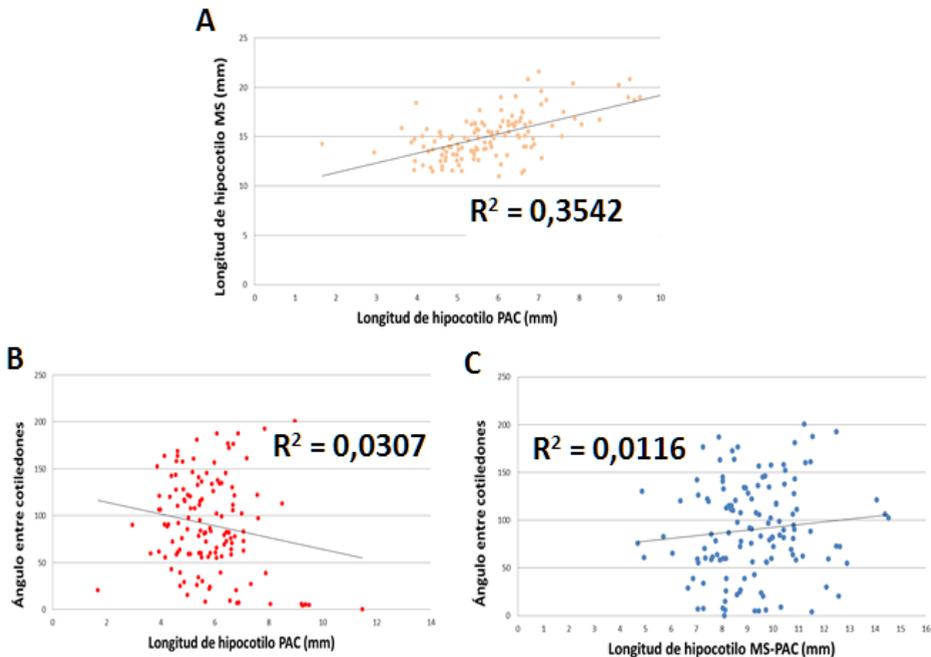


Figura 15. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad: longitud del hipocotilo. A. Longitud de hipocotilo en presencia y ausencia de PAC en plántulas cultivadas durante 7 días en oscuridad. **B.** Ángulo entre cotiledones frente a longitud de hipocotilo en plántulas cultivadas durante 7 días en oscuridad en presencia de PAC. **C.** Ángulo entre cotiledones frente a la diferencia de longitud en presencia y ausencia de PAC en plántulas cultivadas en oscuridad durante 7 días.

Cuando se comparan los valores obtenidos en la apertura de los cotiledones y en la reducción en la longitud del hipocotilo (Figuras 15B

y 15C), se observa que no existe correlación genética ($R^2 = 0,0307$ y $R^2 = 0,0116$), lo que puede indicar que estos rasgos morfológicos se deben a vías de actuación diferentes.

Se observó una mayor variabilidad entre las accesiones cuando se estudió la apertura de cotiledones y sólo en algunos casos se encontró un comportamiento equivalente al estudiar los dos caracteres.

Cuando observamos los datos obtenidos al medir la apertura de los cotiledones y la reducción en la longitud del hipocotilo en las 21 accesiones seleccionadas, sí que encontramos una correlación entre ambos caracteres (Figura 16), indicando que al menos en estas accesiones, los dos caracteres estudiados pueden deberse al efecto de la misma ruta genética. La correlación se hace más evidente en las accesiones con comportamiento intermedio y parece menos clara en las accesiones hipersensibles a PAC.

Al analizar las pendientes de las rectas de regresión, se puede concluir que en las accesiones hiposensibles a PAC y en las de comportamiento intermedio, el inhibidor tiene el mismo efecto tanto en la apertura de los cotiledones como en la longitud del hipocotilo. Sin embargo, parece que las accesiones que son resistentes al inhibidor en la reducción de la longitud del hipocotilo son sensibles en la apertura de los cotiledones (Figura 16A). Al tener una correlación tan baja ($R^2 = 0,6167$), puede que un aumento en la muestra estadística variase el comportamiento de estas accesiones.

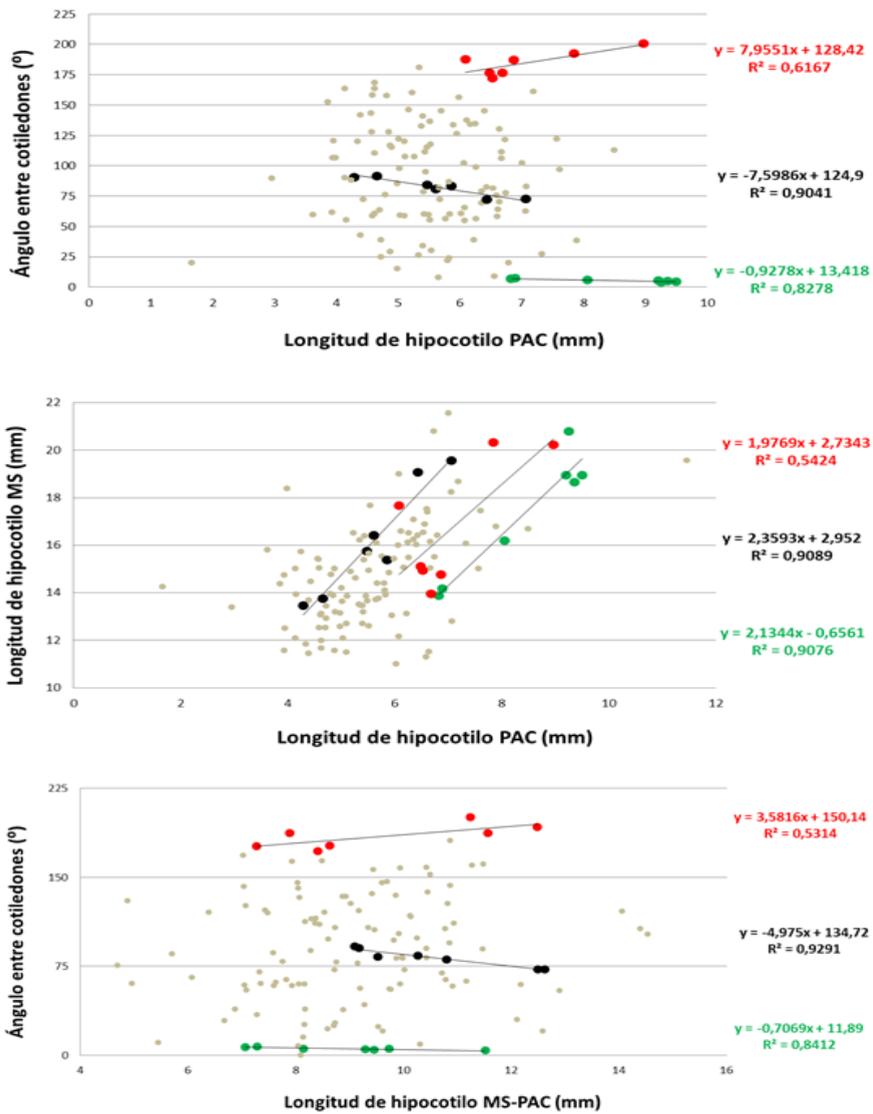


Figura 16. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad: accesiones seleccionadas. A. Longitud de hipocotilo en presencia y ausencia de PAC en plántulas cultivadas durante 7 días en oscuridad. **B.** Ángulo entre cotiledones frente a longitud de hipocotilo en plántulas cultivadas durante 7 días en oscuridad en presencia de PAC. **C.** Ángulo entre cotiledones frente a la diferencia de longitud en presencia y ausencia de PAC en plántulas cultivadas en oscuridad durante 7 días.

Resultados

Para ensayos posteriores se continuó con la selección inicial en función de la apertura de los cotiledones debido a que era un carácter mucho más robusto en el que los errores totales eran menores que en los encontrados al medir la longitud de los hipocotilos (Figura 17).

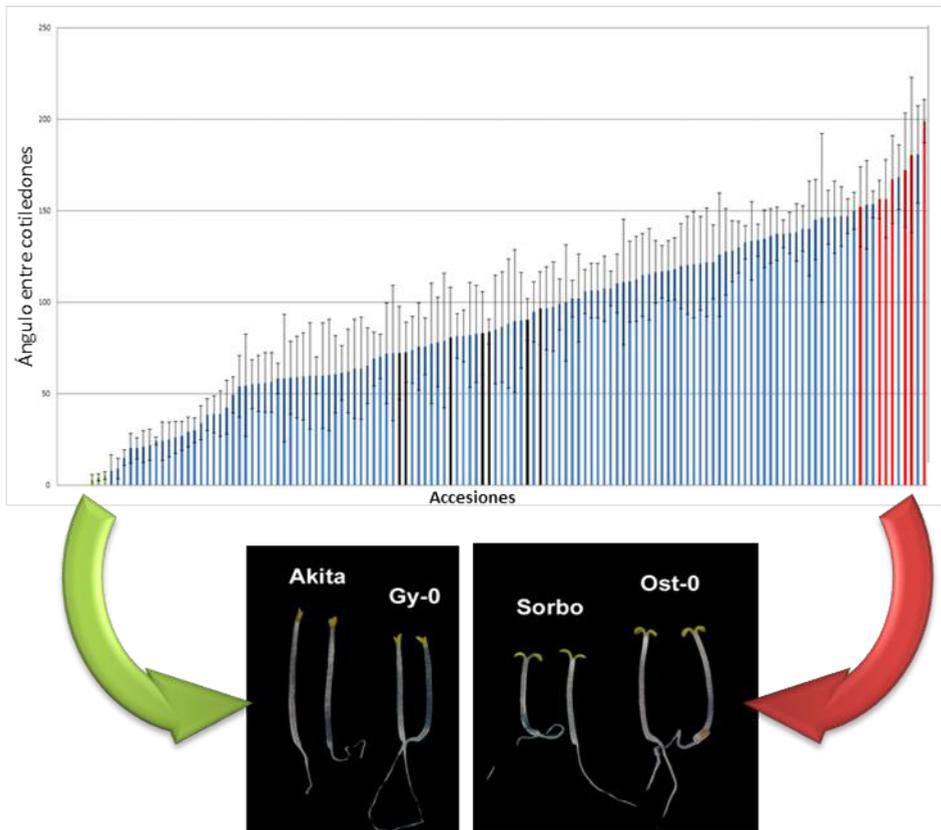


Figura 17. Variación natural en el control de la fotomorfogénesis por GAs en la oscuridad: apertura de cotiledones. Las columnas representan las medias en los ángulos de apertura de cotiledones ($n > 15$) en cada una de las 150 accesiones. En el panel inferior se muestran dos ejemplos de accesiones poco sensibles a PAC (Akita y Gy-0) y dos ejemplos de accesiones muy sensibles a PAC (Sorbo y Ost-0).

Para determinar si el grado de sensibilidad al PAC variaba con la concentración de forma equivalente en las distintas accesiones seleccionadas, se realizó un análisis de dosis-respuesta midiendo la apertura entre los cotiledones a distintas concentraciones de PAC. Como se muestra en la Figura 18, la magnitud de la respuesta de cada accesión fue dependiente de la dosis del inhibidor, cubriendo rangos de concentración variables.

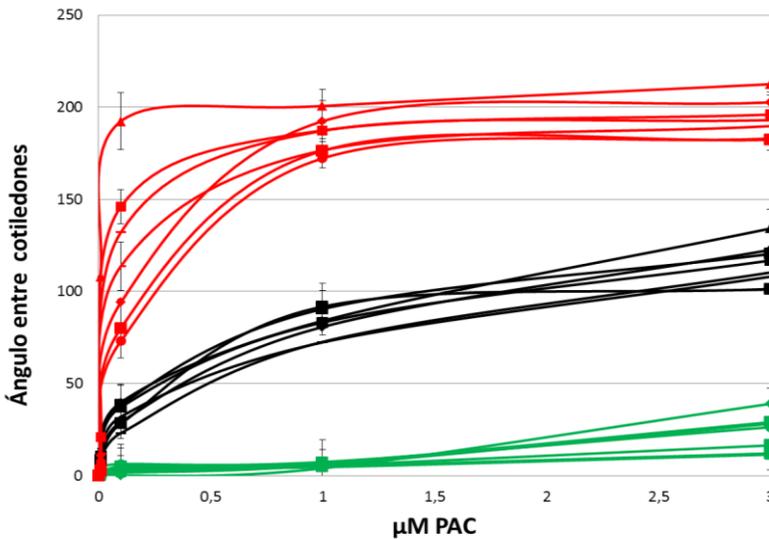


Figura 18. Sensibilidad frente a PAC de las accesiones seleccionadas. La gráfica muestra la respuesta de cada accesión a concentraciones crecientes de PAC, medida a través del ángulo entre cotiledones. Cada valor es la media de al menos 10 plántulas. Las accesiones hipersensibles están representadas en rojo, las accesiones de comportamiento intermedio están representadas en negro y las accesiones resistentes a PAC están representadas en color verde.

Las accesiones hipersensibles (representadas en rojo) y las accesiones de comportamiento intermedio (representadas en negro)

siguen una curva hiperbólica o cinética Michaeliana, lo que podría indicar que la apertura de sus cotiledones se debe directa y exclusivamente a la acción del PAC y que además es un proceso saturante. En cambio, las accesiones resistentes a PAC (representadas en color verde) tienen un comportamiento exponencial, indicando que la apertura de sus cotiledones puede deberse a la acción de distintos elementos que desencadenen la respuesta.

Es decir, algunas accesiones mostraron hipersensibilidad o resistencia a todas las concentraciones de PAC (p. ej. Ost-0), mientras que otras sólo la mostraron a concentraciones elevadas de PAC (p. ej. Ksk-1). Estos resultados apuntan a que entre las variedades naturales seleccionadas existe más de un mecanismo distinto que explique la variación en su comportamiento.

3.2 Análisis transcritoómico de la respuesta a giberelinas en las accesiones *Ler* y No-0.

Para averiguar si la variabilidad de respuesta que observamos con el análisis del fenotipo morfológico tenía una correlación con el fenotipo molecular global, interrogamos el transcriptoma de plántulas de la accesión No-0, que es hipersensible a GAs, y de *Ler*, que presenta un comportamiento intermedio, en respuesta al tratamiento con PAC. Dicho análisis transcritoómico se realizó hibridando ARNs de plántulas *Ler* y No-0 sobre micromatrices de oligonucleótidos de Affymetrix siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

Con los resultados del análisis transcriptómico esperaríamos dos posibles escenarios (Figura 19):

- Que la respuesta de No-0 a la deficiencia de GAs sea menor de forma generalizada. Esto nos indicaría que en esta accesión la ruta estaría alterada a un nivel superior y por eso todas las dianas de las giberelinas, ya sean directas o indirectas, tendrían una expresión diferencial.
- Que la expresión diferencial sólo tenga lugar en un grupo o categoría de genes; lo que nos indicaría que la alteración en No-0 se encontraría al final de la vía.

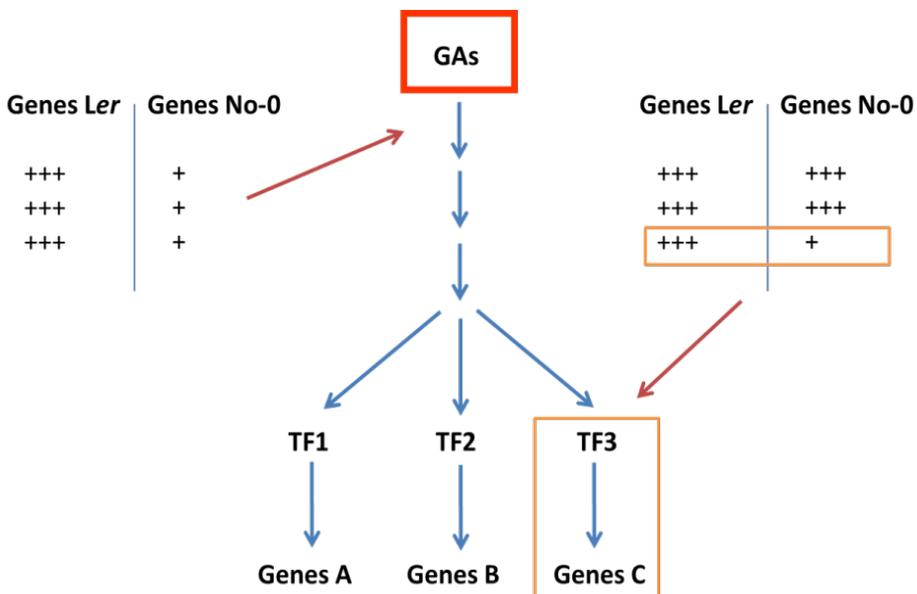


Figura 19. Esquema simplificado de la regulación de las GAs sobre determinados genes.

Resultados

En el caso de la accesión *Ler*, el análisis transcriptómico ha revelado que un 12% de los genes aumenta su transcripción en ausencia de GAs, un 15% disminuye y el 73% de los genes no se regula de forma estadísticamente considerable. En el análisis transcriptómico de la accesión No-0 encontramos que un 9% de los genes aumentan su transcripción en ausencia de GAs, un 12% disminuye y un 79% de los genes no ve afectada su transcripción de manera significativa. La comparación global del transcriptoma de plántulas *Ler* versus plántulas No-0 revela que un total de 307 transcritos se encontraban significativamente alterados con un valor de p corregido para FDR (*False Discovery Rate*) inferior a 0.05; es decir, 307 genes tienen una transcripción estadísticamente distinta en ambas accesiones. De los genes cuya transcripción se ve alterada significativamente, 151 presentan un aumento o disminución de 1.0 en valor absoluto en los niveles de transcrito en plántulas No-0 con respecto a plántulas *Ler*. De este conjunto de genes, 96 están regulados al alza y 55 a la baja en *Ler* con respecto a No-0 (Figura 20).

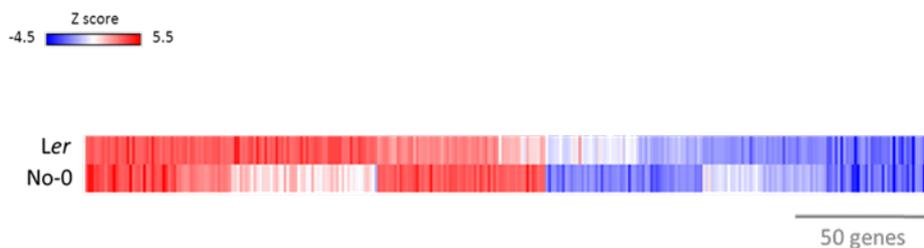


Figura 20. Análisis transcriptómico *Ler/No-0* en PAC. Representación de los z-scores de los 307 genes del análisis transcriptómico. En color rojo están representados los genes cuya expresión se induce en ausencia de GAs y en color azul los genes cuya expresión se reprime.

Usando los z-scores sólo de los 307 genes diferenciales, la pendiente No-0/Ler es menor que 1 ($m = 0,8$), lo que indica que No-0 es hiperresistente a la deficiencia de GAs (Figura 21A). Sin embargo, al representar los z-scores de todos los genes del análisis transcriptómico (3957 genes) vemos que la pendiente No-0/Ler es todavía menor ($m = 0,6$); indicando que la respuesta de No-0 es menor en general y no en un grupo de genes concreto (Figura 21B).

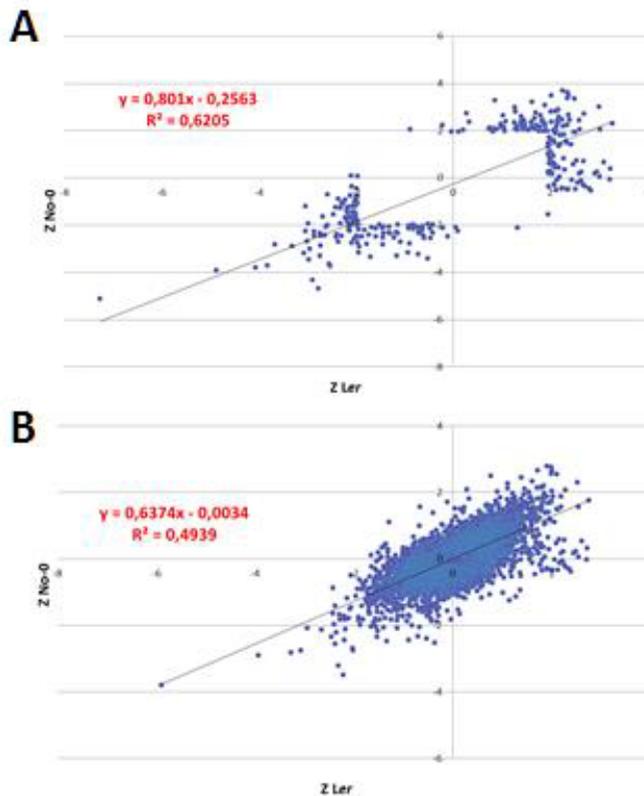


Figura 21. Z-scores del análisis transcriptómico Ler/No en PAC. A. Diagrama de dispersión de los z-scores de los 307 genes que presentan un comportamiento diferencial. **B.** Diagrama de dispersión de los z-scores de todos los genes del análisis transcriptómico.

Mediante la herramienta ReviGO (Supek et al 2011) se han analizado las categorías funcionales sobrerrepresentadas en los genes regulados al alza y los genes regulados a la baja en las dos accesiones (Figuras 22 y 23).

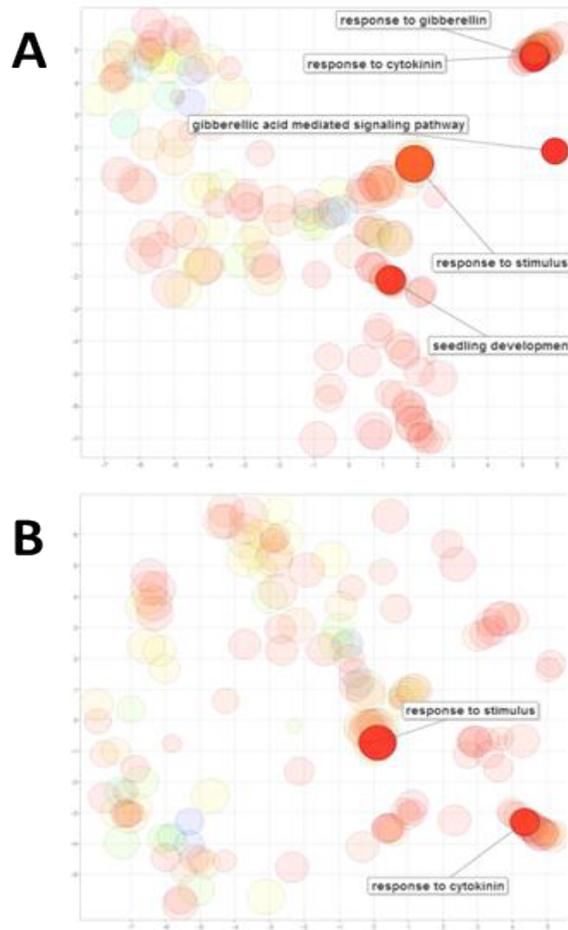


Figura 22. Categorías funcionales sobrerrepresentadas en el análisis transcriptómico. A. Análisis transcriptómico de Ler: genes que aumentan su expresión en ausencia de GAs. **B.** Análisis transcriptómico de No-o: genes que aumentan su expresión en ausencia de GAs.

Al comparar las categorías funcionales sobrerrepresentadas en los análisis transcriptómicos de *Ler* y de No-0, podemos ver que los genes que aumentan su expresión en ausencia de GAs son sobre todo los de respuesta a estímulos. Sin embargo, en la accesión *Ler* están sobrerrepresentadas las categorías funcionales de respuesta a GAs y a la vía de señalización del ácido giberélico, mientras que en No-0 no se han activado los genes de estas categorías (Figura 22).

La principal categoría funcional sobrerrepresentada en los genes de *Ler* y de No-0 que reprimen su expresión en ausencia de GAs es la de respuesta a estímulos (Figura 23). Se puede ver que en *Ler* están sobrerrepresentadas las categorías de crecimiento y respuesta a auxinas y brasinosteroides; en cambio en No-0 se reprimen los genes en respuesta a ausencia de luz.

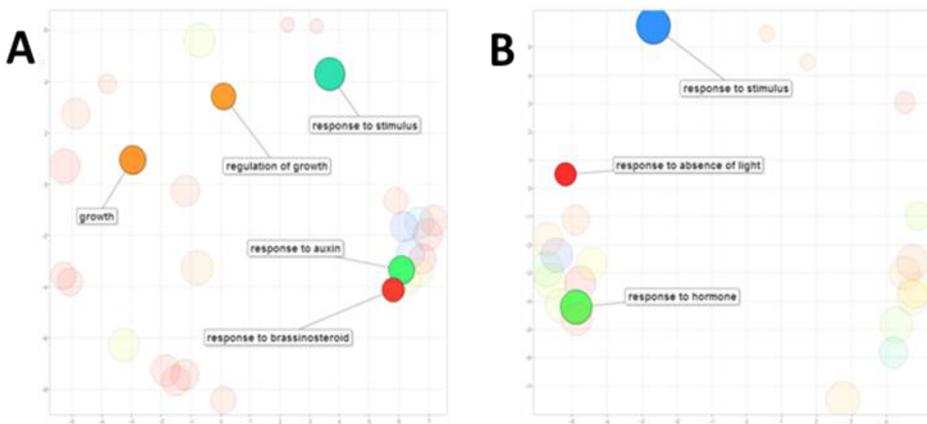


Figura 23. Categorías funcionales sobrerrepresentadas en el análisis transcriptómico. A. Análisis transcriptómico de *Ler*: genes que reprimen su expresión n en ausencia de GAs. **B.** Análisis transcriptómico de No-0: genes que reprimen su expresión en ausencia de GAs.

Resultados

Al analizar las categorías funcionales de los genes que se expresan de forma diferencial en PAC, podemos ver que hay ciertos grupos más representados que otros, es decir, la ausencia de GAs en *Ler* afecta a determinados grupos de genes que en la accesión No-0 no se ven alterados. Esto nos indica que la alteración en la respuesta a GAs de esta accesión tiene lugar a nivel general y no a nivel particular. Sin embargo, la respuesta de estas dos accesiones es similar en las categorías funcionales principales del desarrollo (Figura 24).

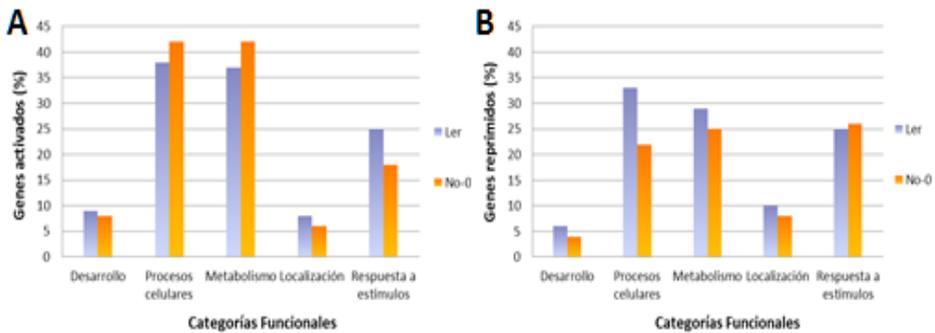


Figura 24. Categorías funcionales sobrerrepresentadas y porcentaje de genes incluidos en ellas. En la gráfica se muestra el porcentaje de genes cuya transcripción se ve alterada significativamente, en función del grupo de ontología genética al que pertenecen.

Con el fin de determinar si algunas dianas directas de las proteínas DELLA podrían estar afectadas en la accesión No-0, se han comparado los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de plántulas etioladas *Ler*/No-0 en PAC con los datos conocidos de los genes regulados por GAI (Gallego-Bartolome et al 2011a). Como se puede ver en la Figura 25, hay 26 genes que se expresan de forma diferencial y que son dianas directas de *GAI*.

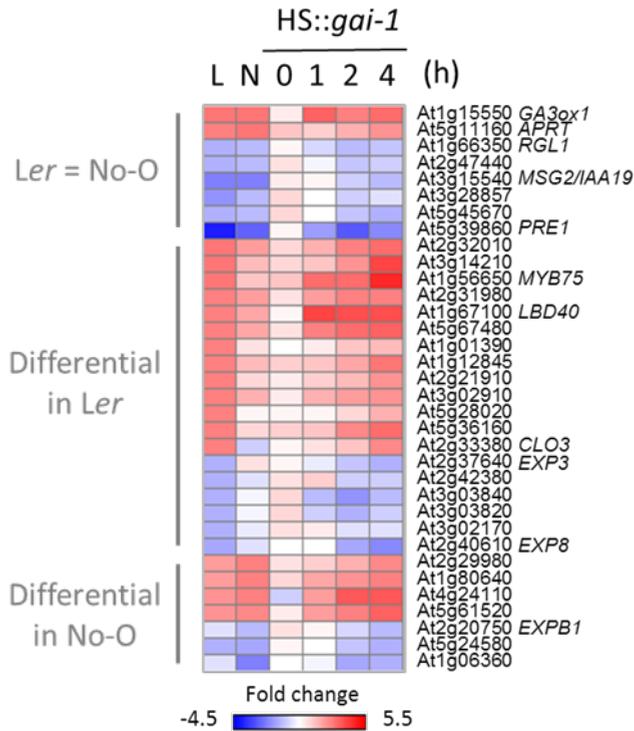


Figura 25. Análisis comparativo de micromatrices Ler/No y HS::*gai-1*. Aparecen 26 genes con comportamiento diferencial en No respecto a Ler y que son dianas directas de GAI.

3.3 Estudio de asociación de genes candidatos.

Los resultados mostrados sirvieron para proponer la hipótesis de que algunos de los genes que codifican elementos de señalización por GAs, o que participan en el control de esta respuesta por GAs (Alabadi et al 2004, Alabadi et al 2008), pueden haber sido las dianas que hayan permitido a ciertas accesiones modificar su respuesta natural a esta hormona. Para ello nos centramos en los genes que codifican las proteínas DELLA *GAI* (Peng and Harberd 1993) y *RGA* (Silverstone et

al 1998); los 3 receptores de GAs *GID1a*, *GIDb* y *GID1c* (Nakajima et al 2006); la proteína “F-box” *SLY1* (McGinnis et al 2003); y dos factores de transcripción, *PIF3* (Ni et al 1998) y *HY5* (Oyama et al 1997). Las regiones codificantes y los intrones de cada uno de estos genes se amplificaron por PCR y se secuenciaron a partir de DNA genómico de cada una de las accesiones seleccionadas. La secuencia de estos genes se analizó *in silico* con el programa *SeqMan*; se utilizó como referencia la secuencia de la accesión Col-0.

La secuencia del gen *SLY1* está totalmente conservada en las accesiones analizadas ya que no se encontró ningún polimorfismo. La ausencia de polimorfismos también puede verse influida por el pequeño tamaño del gen (930 pb).

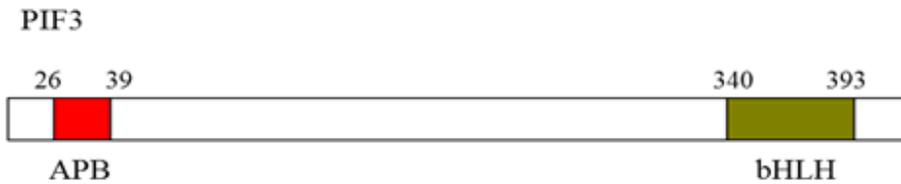
Los genes *GID1a*, *GID1b* y *GID1c* presentaron polimorfismos en las secuencias codificantes pero todos constituyeron cambios silenciosos.

En el gen *HY5* sólo se encontró un polimorfismo no silencioso (S → N) en la posición 76 de las accesiones Bla-1, Akita, Gy-0, Ga-0, Ksk-1, Ren-1, Mrk-0, Wt-1, Mr-0 y Ost-0; entre estas accesiones se incluyen representantes de los tres grados de sensibilidad identificados, por lo que no se encuentra ninguna asociación entre dicho polimorfismo y la intensidad del fenotipo de cada accesión.

En el resto de los genes analizados, salvo *GAI* (Tabla 3), no se encontraron cambios drásticos en las secuencias de aminoácidos: a pesar de que aparecieron numerosos polimorfismos que implicaban un

cambio en la naturaleza del aminoácido diferencial (Tablas 1, 2, 3) ninguno correlacionaba con el fenotipo observado; es decir, no parece probable que ninguno de estos cambios observados tenga *a priori* consecuencias en la actividad de las proteínas estudiadas que sean relevantes en la sensibilidad a GAs.

Tabla 1. Variaciones alélicas en el gen PIF-3 para 19 accesiones. Se muestran en la tabla los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-0 está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente.

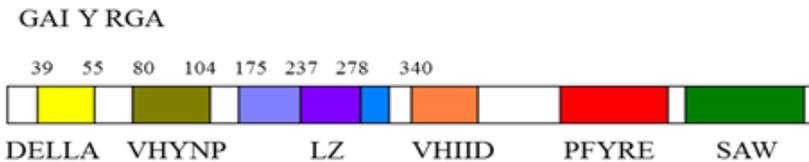


PIF-3	124	141	176	186	209	217	220	236	407	425	468	482	485
POSICION													
Bla-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Akita	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Gy-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Di-2	E	K	Q	Q	F	del	T	V	M	T	A	S	D
Knox-18	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Mr-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Col-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	A	G	S	G
Ei-2	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Cvi	E	K	Q	Q	F	del	T	V	M	T	A	S	D
Mrk-0	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	T	G	S	G

Resultados

Wt-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
Oy-0	D	N	H	K	L	del	I	I	M	T	A	S	G
Ost-0	D	N	H	K	L	del	I	I	M	T	A	S	G
Wa-1	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	A	G	S	G
Ren-1	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	S	G
UII2-3	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	A	G	S	G
Sorbo	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Ga-0	E	K	Q	Q	F	del	T	V	L	T	G	P	G
Ksk-1	E	K	Q	Q	F	N	T	V	L	T	G	S	G

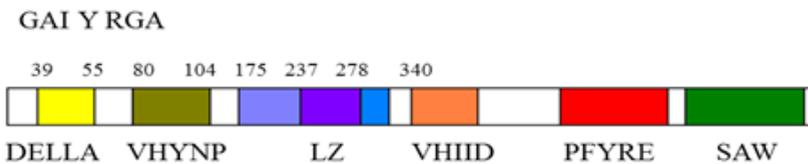
Tabla 2. Variaciones alélicas en el gen RGA para las 20 accesiones. Se muestran los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-0 está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente. Los dominios representados en la figura se han definido en la proteína DELLA de *O. sativa* SLR-1 (Itoh et al 2002).



RGA	7	13	14	182	197	198	199	200	203	210	587
POSICIÓN											
Bla-1	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Akita	Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	Y
Gy-0	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Di-2	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Knox-18	Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Mr-0	Q	S	N	A	del	del	del	del	A	I	H
Col-0	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H

Ler	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Ei-2	Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Cvi	Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Mrk-0	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Wt-1	Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	Y
Oy-0	del	del	del	T	T	T	T	T	A	I	H
Ost-0	Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y
Wa-1	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	H
Ren-1	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
UII2-3	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	V	Y
Sorbo	Q	S	N	T	T	T	T	T	A	I	Y
Ga-0	Q	S	N	T	T	T	T	M	A	I	H
Ksk-1	Q	S	N	T	T	T	T	T	G	I	Y

Tabla 3. Variaciones alélicas en el gen GAI para las 20 accesiones. Se muestran en la tabla los polimorfismos que generan un cambio de aminoácido. El aminoácido que difiere de la secuencia de Col-0 está representado en color rojo. “del” indica la ausencia del aminoácido correspondiente. Los dominios representados en la figura se han definido en la proteína DELLA de *O. sativa* SLR-1 (Itoh et al 2002). Aparece un codón de parada en la posición 112 de la accesión Bla-1.



GAI	10	62	112	156	160	314	386	394	409
POSICIÓN									
Bla-1	del	E	//*						
Akita	del	E	N	P	L	F	S	E	V

Resultados

Gy-0	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Di-2	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Knox-18	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Mr-0	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Col-0	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Ler	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ei-2	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Mrk-0	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Wt-1	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Oy-0	del	D	N	H	V	F	S	E	V
Ost-0	H	E	N	H	V	F	G	E	I
Wa-1	del	E	N	H	V	F	G	Q	I
Ren-1	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ull2-3	del	E	N	H	V	del	G	E	I
Sorbo	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ga-0	del	E	N	H	V	F	G	E	I
Ksk-1	del	E	N	H	V	F	G	E	I

En la accesión Bla-1, la delección de una citosina (Tabla 3) en la posición 333 genera un cambio en la pauta de lectura del gen *GAI* que tiene como consecuencia la aparición de un codón de parada 24 tripletes después de dicha delección (Figura 26). La proteína truncada resultante tendría un tamaño aproximado de 17,3 kDa.

En resumen, la proteína GAI^{Bla} , tiene un tamaño mucho menor que *GAI* y tiene en su secuencia 24 aminoácidos distintos. Por lo tanto carece de la región GRAS aunque sí conserva la región DELLA y la región de localización nuclear.

A

GAI^{Bla}	M	K	R	D	H	-	H	H	H	Q	D	K	K	T	M	M
GAI	M	K	R	D	H	H	H	H	H	Q	D	K	K	T	M	M
GAI^{Bla}	M	N	E	E	D	D	G	N	G	M	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	V
GAI	M	N	E	E	D	D	G	N	G	M	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	V
GAI^{Bla}	L	G	Y	K	V	R	S	S	E	M	A	D	V	A	Q	K
GAI	L	G	Y	K	V	R	S	S	E	M	A	D	V	A	Q	K
GAI^{Bla}	L	E	Q	L	E	V	M	M	S	N	V	Q	E	D	D	L
GAI	L	E	Q	L	E	V	M	M	S	N	V	Q	E	D	D	L
GAI^{Bla}	S	Q	L	A	T	E	T	V	H	Y	N	P	A	E	L	Y
GAI	S	Q	L	A	T	E	T	V	H	Y	N	P	A	E	L	Y
GAI^{Bla}	T	W	L	D	S	M	L	T	D	L	N	P	P	S	S	N
GAI	T	W	L	D	S	M	L	T	D	L	N	P	P	S	S	N
GAI^{Bla}	A	E	Y	D	L	K	A	I	P	G	D	A	I	L	<u>I</u>	<u>S</u>
GAI	A	E	Y	D	L	K	A	I	P	G	D	A	I	L	<u>N</u>	<u>Q</u>
GAI^{Bla}	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>I</u>
GAI	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>D</u>
GAI^{Bla}	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>									
GAI	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	. . .								

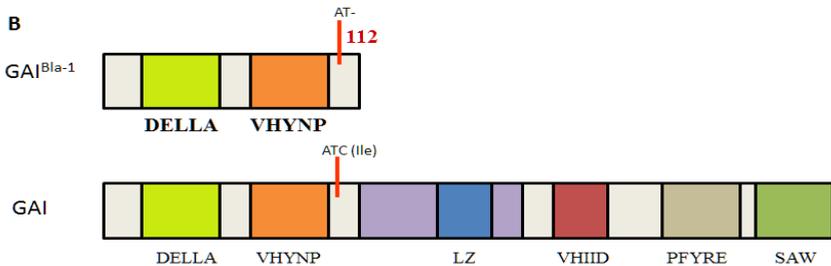


Figura 26. Estructura primaria de GAI^{Bla}. **A.** La estructura primaria de GAI^{Bla} coincide con la de GAI en la accesión de referencia Col-0 hasta el aminoácido 112. Después de 24 aminoácidos que difieren de la secuencia consenso, la proteína se trunca. **B.** La proteína GAI^{Bla} es aproximadamente 3 veces más pequeña que GAI silvestre, conservando el dominio DELLA con el que interacciona con los receptores de GAs.

3.4 Caracterización funcional del alelo *GAI^{Bla}*.

Dado que el alelo *GAI^{Bla}* codificaba una versión altamente truncada de GAI, la primera hipótesis que barajamos fue que éste era un

Resultados

alelo nulo. La presencia de este alelo podía suponer una desrepresión de la señalización por GAs y así contribuir a la insensibilidad al PAC en la respuesta de apertura de cotiledones en esta accesión. Para probar esta hipótesis primero determinamos la dominancia o recesividad de la hipersensibilidad a GAs en esta accesión, dado que un alelo nulo debería comportarse de una manera recesiva. Para ello se analizó la respuesta de ambos caracteres al PAC en plántulas F1 del cruce entre dicha accesión y Col-0, que presenta un comportamiento intermedio (Figura 27).

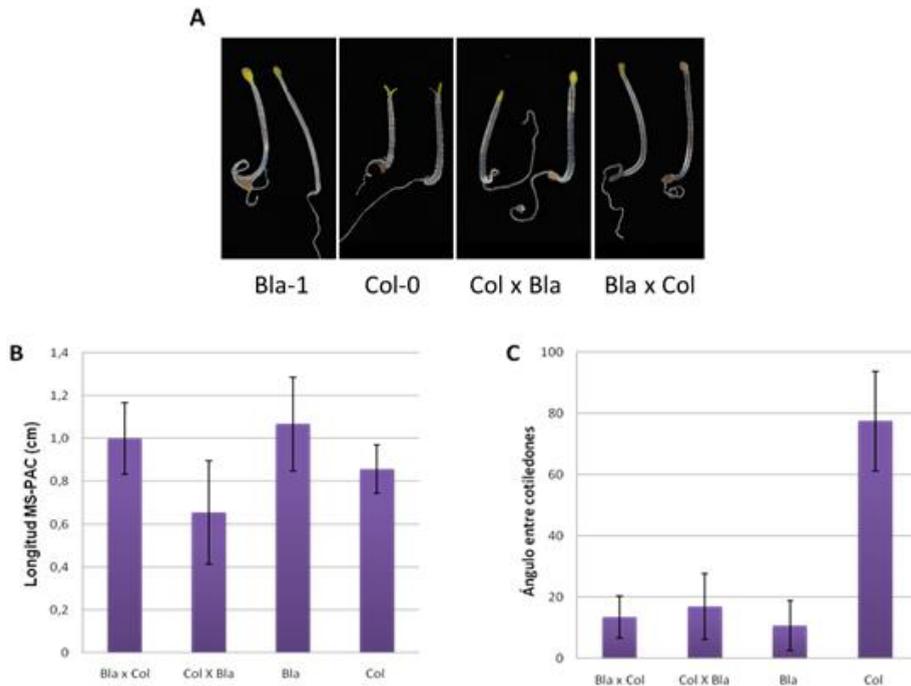


Figura 27. Fenotipo de las plantas F1 de cruces Col-0 x Bla-1 y recíprocos. A. Fotos de plántulas representativas (n>15). **B.** Cuantificación de altura de hipocotilo. **C.** Apertura entre los cotiledones. Plántulas F1 de cruces recíprocos y de los parentales cultivados en oscuridad durante 7 días en presencia o ausencia de PAC 1 μ M.

A pesar de que las plántulas de la accesión Bla-1 eran un poco más altas que las de la accesión Col-0 (Figura 27A), no se encontraron diferencias significativas en la longitud del hipocotilo entre los parentales y los cruces (Figura 27B); sin embargo, el ángulo de apertura entre los cotiledones en las plántulas resultantes de los cruces Col-0 x Bla-1 y Bla-1 x Col-0, es equivalente al ángulo observado en la accesión Bla-1.

A la vista de los resultados obtenidos se podría decir que hay uno o más alelos con efecto dominante que contribuyen a la hipersensibilidad a GAs de la accesión Bla-1. ¿Es GAI^{Bla} uno de estos alelos? La dominancia del carácter apuntaba a que si ésta se debe en parte a GAI^{Bla} , este alelo debe representar una versión dominante negativa, por ejemplo, interfiriendo con la actividad de las demás proteínas DELLA (Figura 28).

Nuestra hipótesis de que GAI^{Bla} actuaba como un alelo dominante negativo frente al resto de proteínas DELLA, implicaba que debían cumplirse tres premisas:

- (i) la proteína truncada se tiene que acumular en la célula,
- (ii) tiene que ser nuclear, y
- (iii) debe formar heterodímeros, sobre todo con RGA, ya que GAI y RGA son las DELLA que contribuyen en mayor medida a la sensibilidad a GAs durante la escotomorfogénesis (Alabadi et al 2004).

Resultados

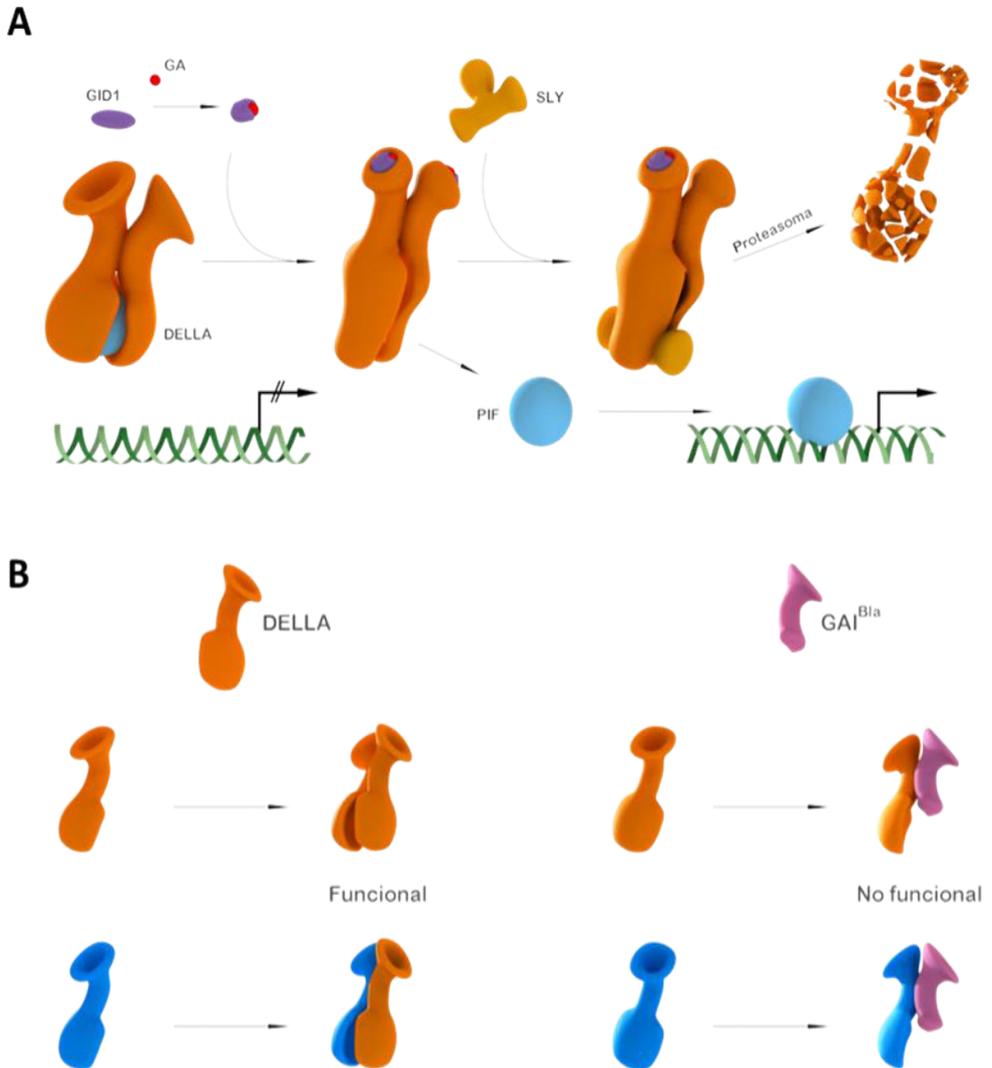


Figura 28. Modelo teórico de la interacción de GAI^{Bla} con el resto de proteínas DELLA. A.

Las proteínas DELLA, forman dímeros cuya función es reprimir la actividad de los elementos PIF. En oscuridad, el complejo formado por las GAs y los receptores GID se une a las DELLA, induciendo un cambio conformacional que libera a PIF permitiendo por un lado la transcripción de los genes de escotomorfogénesis y por otro lado la unión de SLY, la ubiquitinación de las DELLA y su degradación vía proteasoma. **B.** La proteína GAI^{Bla} carece del extremo N-terminal, por lo que no formaría dímeros funcionales con otras DELLA.

3.4.1 Acumulación celular de GAI^{Bla} .

En primer lugar investigamos si la proteína truncada GAI^{Bla} se podía detectar en plántulas de la accesión Bla-1. Para ello cultivamos plántulas silvestres de esta accesión y de *Ler* durante siete días en luz continua en medio control y en medio suplementado con 1 μ M PAC y 1 μ M PAC + 50 μ M GA_3 . A continuación extrajimos las proteínas totales y analizamos la presencia de GAI y GAI^{Bla} por western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-GAI (Piskurewicz et al 2008). Como controles analizamos en paralelo muestras de los mutantes nulos *gai-t6* y *rga-24* (Dill and Sun 2001), que no acumulan GAI ni RGA, respectivamente.

Como se puede observar en la figura 29A, una banda que migra a la altura esperada para GAI se puede detectar en las muestras de *Ler* silvestre y en la de *rga-24*, mientras que está ausente en *gai-t6* y en las muestras de Bla-1. Además, como cabía esperar, los niveles de GAI son mayores en la muestra tratada con PAC que en el control y en la que se ha tratado simultáneamente con PAC + GA_3 . Pero lo más importante, el anticuerpo detecta una banda del tamaño esperado para GAI^{Bla} en las muestras de Bla-1, y cuyos niveles no se ven alterados cuando se modifican los niveles endógenos de GAs (Figura 29B). Este comportamiento es consistente con la delección de la región C-terminal en la proteína GAI^{Bla} , que es la que media la interacción con el complejo SCF^{SLY1} y por tanto debe ser resistente al tratamiento con GAs (Harberd et al 2009).

Resultados

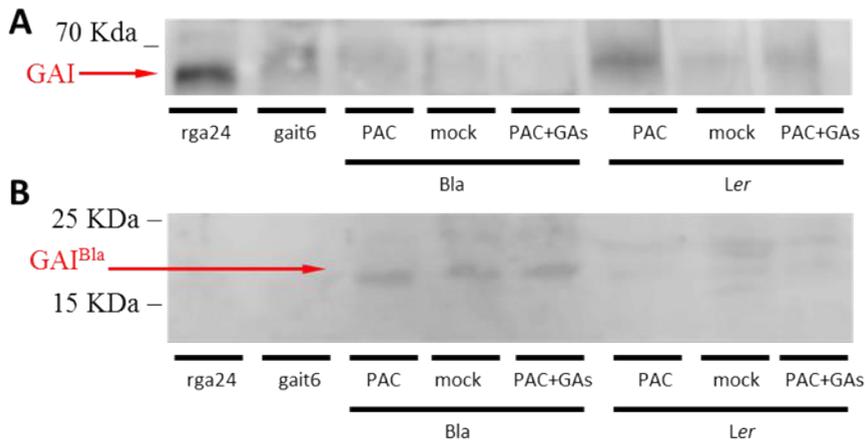


Figura 29. Western blot. Abundancia GAI/RGA en extractos de *A. thaliana*. 20 µg de proteína detectados con anticuerpo anti-GAI. **A.** Parte superior del gel con los controles utilizados en el ensayo. **B.** Parte inferior del gel en la que se puede ver la proteína GAI^{Bla} con un tamaño aproximado de 20 KDa.

3.4.2 Localización de GAI^{Bla}.

A continuación caracterizamos la localización subcelular de GAI^{Bla} y volvimos a comprobar su sensibilidad a GAs mediante expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* (benthamiana). Se expresó en hojas de benthamiana la construcción $35S::YFP-GAI^{Bla}$, y se observó la fluorescencia de YFP en el microscopio confocal antes y después de aplicar GAs (Figura 30). Se usaron como controles las construcciones $35S::YFP-GAI$ y $35S::YFP-gai-1$. GAI se degrada rápidamente al aplicar GAs mientras que *gai-1*, que carece del motivo DELLA y no puede interactuar con el complejo GID1-GA, es estable. La fluorescencia correspondiente a YFP-GAI^{Bla} se observó en los núcleos de las células epidérmicas de las hojas de benthamiana, indicando que la proteína de fusión presentaba localización nuclear.

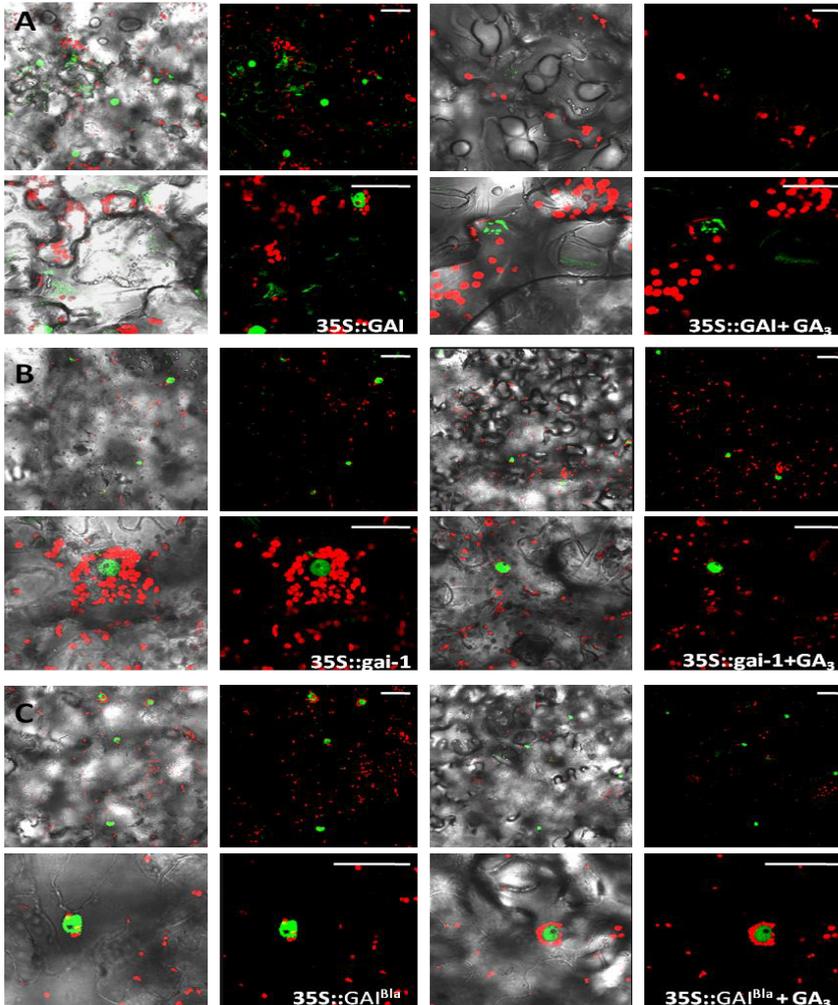


Figura 30. La primera imagen corresponde a la superposición de campos y la segunda a la fluorescencia de YFP (verde) y de los cloroplastos (rojo). **A.** Expresión transitoria de *35S::GAI:YFP* en hojas de *Nicotiana benthamiana* antes y después de la aplicación de GA_3 50 μ M. Se puede observar una clara reducción del número de núcleos, así como una diferencia en la estructura de los mismos. **B.** Expresión transitoria de *35S::gai-1:YFP* en *N. benthamiana* antes y después de la aplicación de GA_3 50 μ M. No se observan diferencias significativas antes y después del tratamiento. **C.** Expresión transitoria de *35S::GAI^{Bla}:YFP* en *N. benthamiana* antes y después de la aplicación de GA_3 50 μ M. No se observan diferencias significativas antes y después del tratamiento.

Y como era esperable, esta proteína fue insensible a un tratamiento con GAs: mientras la fluorescencia de la proteína YFP:GAI es difícilmente detectable tras el tratamiento, la correspondiente a YFP-GAI^{Bla}, al igual que la de YFP-gai-1, se mantiene estable 24 h después de la aplicación de la hormona.

3.4.3 Dimerización de GAI^{Bla}

Para comprobar la tercera premisa, estudiamos la interacción entre las proteínas DELLA mediante el sistema de doble híbrido en levadura. En primer lugar se comprobó mediante western blot que todas las construcciones se expresaban de manera equiparable en levadura (Figura 31).

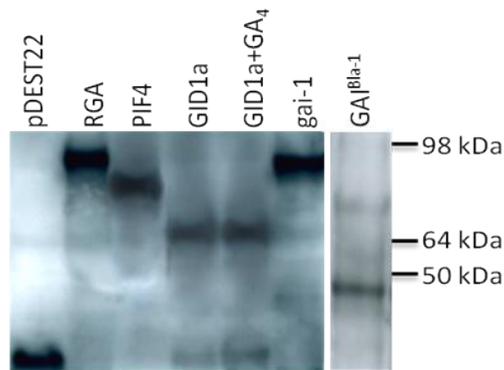


Figura 31. Western blot. Abundancia de las distintas proteínas (pDEST22:X) en extractos de levadura. Las proteínas de fusión fueron detectadas con anticuerpo anti-AD, menos GAI^{Bla} que se detectó con anti-BD.

Debido a que el alelo GAI^{Bla} posee el dominio DELLA, como control positivo se usó la pareja GAI^{Bla}-GID1a (Griffiths et al 2006). Como controles negativos se usaron las parejas GAI^{Bla} con el vector

vacío pDEST22 y GAI^{Bla} con PIF4, ya que al carecer del extremo C-terminal GAI^{Bla} debería ser incapaz de interactuar con los elementos PIF (de Lucas et al 2008). Se obtuvieron los resultados esperados en las interacciones control, pero como se puede ver en la Figura 32A, la proteína GAI^{Bla} es capaz de activar por sí sola la transcripción del gen *HIS3* y por tanto las levaduras son capaces de crecer en un medio sin histidina, lo que dificultó sacar conclusiones acerca de la posible interacción con RGA. Por esta razón se decidió ensayar las interacciones en levadura haciendo uso de un testigo alternativo, como es midiendo la actividad β -Gal codificada por *LacZ*, cuya expresión es directamente proporcional a la fuerza de la interacción.

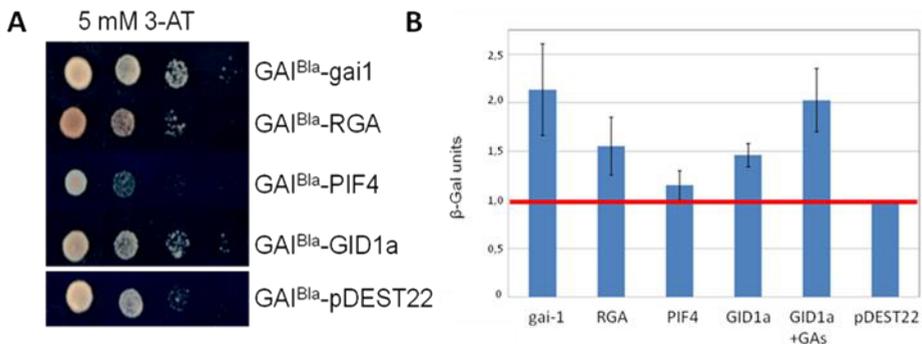


Figura 32. Doble híbrido de levadura. A. Colonias creciendo en medio His-, Leu-, Trp- a una concentración de 3AT de 5 mM. **B.** Ensayo β -Gal de las interacciones de GAI^{Bla} con distintas proteínas de la vía de señalización de GAs.

Para el ensayo β -Gal (Figura 32B), se utilizaron los mismos controles y se añadió como control positivo la pareja GAI^{Bla} -GID1a con GA_4 en el medio de cultivo (Griffiths et al 2006). Como se puede ver en la figura no se observa señal en el control negativo GAI^{Bla} -PIF4 y se

Resultados

observa un aumento de la señal de 1,5 veces en la interacción GAI^{Bla}-GID1a que aumenta en presencia de GAs. Pero lo que es más importante, una señal similar a la de los controles positivos se detecta al enfrentar GAI^{Bla} con gai-1 y con RGA, indicando que esta proteína tiene la capacidad de formar dímeros con otras proteínas DELLA.

Con el fin de averiguar si las interacciones observadas en levadura tenían lugar también en planta, se llevó a cabo un ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia en hojas de *N. benthamiana* con las proteínas GAI^{Bla}, gai-1, RGA y GAI fusionadas a los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína YFP (Figura 33). Tres días después de la agro-infiltración, se observaron las plantas en el microscopio confocal. De nuevo, se pudo demostrar la formación de heterodímeros entre RGA y GAI^{Bla}.

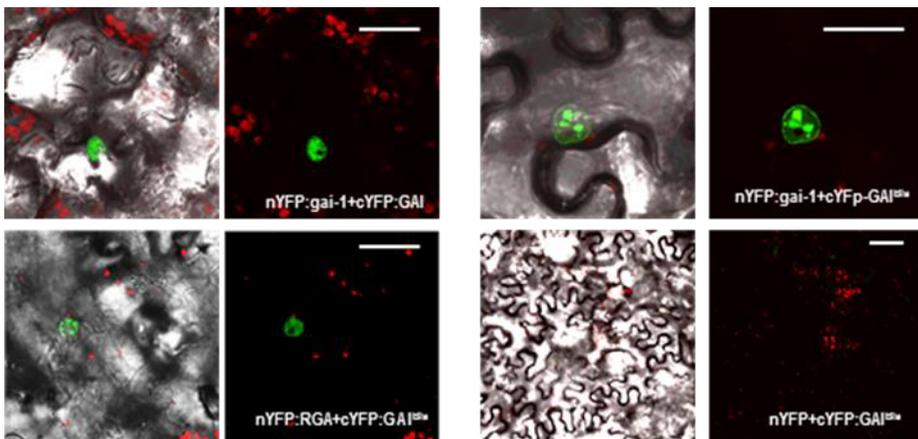


Figura 33. Ensayo BiFC para las interacciones con la proteína GAI^{Bla}. Fluorescencia de YFP en los núcleos de las células de *N. benthamiana* después de agro-infiltrar. La primera imagen corresponde a la superposición de campos y la segunda a la fluorescencia de YFP (verde) y de los cloroplastos (rojo).

3.4.4 GAI^{Bla} como alelo dominante negativo.

Los resultados de las interacciones apuntan a que GAI^{Bla} tiene la capacidad para formar heterodímeros, que era una de las premisas que se tenían que cumplir si nuestra hipótesis de que este alelo especial tiene un papel dominante negativo era cierta. A continuación, para determinar si el fenotipo observado en la F1 del cruce Col-0 x Bla-1 era debido únicamente a la contribución de GAI^{Bla} , se generaron líneas homocigotas en fondo silvestre Col-0 transformadas con la construcción $35S::GAI^{Bla}:YFP$ (Figura 34).

Obtuvimos 20 transformantes primarios (T1s) de los cuales seleccionamos tres líneas (8.5, 10.1 y 19.1) que presentaban segregación 3:1 (resistente:sensible) al glifosato, conferida por la presencia del transgén en la generación T2 e indicando que éste se había insertado en un único sitio en el genoma.

En primer lugar se comprobó que la proteína de fusión se estaba expresando y que su localización era nuclear en cada una de las tres líneas seleccionadas (Figura 34A). En la figura se observa la fluorescencia procedente de la proteína de fusión en los núcleos de las células epidérmicas de la parte superior de los hipocotilos de plántulas crecidas en luz continua. A continuación se midió la apertura de los cotiledones de las líneas homocigotas Col- GAI^{Bla} crecidas siete días en oscuridad en presencia de PAC 1 μ M, encontrando que las tres líneas tenían los cotiledones con una apertura menor de 10° o completamente cerrados (Figura 34B y C).

Resultados

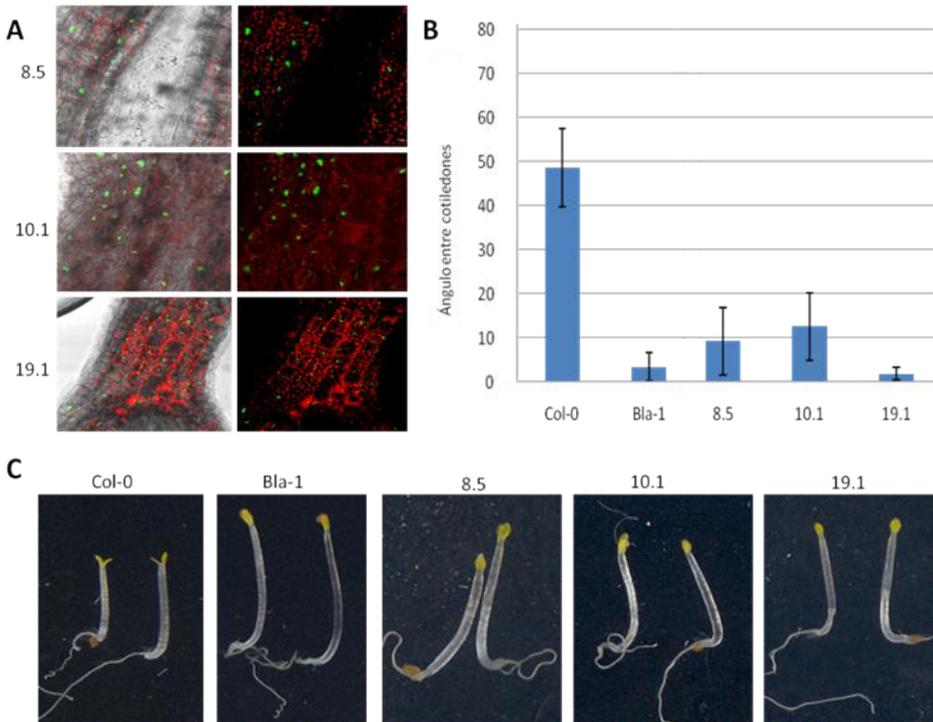


Figura 34. Apertura de cotiledones en líneas homocigotas Col-GAI^{Bla}. **A.** Localización subcelular de YFP-GAI^{Bla} en plántulas de 3 líneas T3 homocigotas crecidas 7 días en luz continua. Los números a la izquierda de los paneles identifican las distintas líneas transgénicas. **B.** Apertura en grados de los cotiledones de las 3 líneas homocigotas y de los silvestres de las accesiones Col-0 y Bla-1. **C.** Fotos de plántulas representativas del experimento mostrado en B.

Con estos resultados podemos confirmar que la hipersensibilidad a GAs, o hiposensibilidad a PAC, de la accesión Bla-1 se debe a la contribución de la proteína GAI^{Bla}. No obstante, nuestros resultados todavía nos dejan una pregunta abierta: ¿por qué la hipersensibilidad a GAs ocurre sólo en la apertura de cotiledones y no en la altura de hipocotilo, a pesar de usar un promotor constitutivo? Una

posibilidad es que la apertura de cotiledones sea más sensible que la longitud del hipocotilo a niveles de GAs y que los resultados de las transgénicas sean una consecuencia de los niveles de expresión, *i.e.* en otras líneas con mayor expresión veríamos un efecto mayor en la longitud de los hipocotilos y posiblemente en otras respuestas.

Además, una idea muy interesante que se desprende de nuestros resultados es la posibilidad de emplear este alelo dominante negativo como una herramienta biotecnológica para desbloquear la señalización por GAs de una manera específica, en comparación con la desrepresión general en la vía que se consigue con los mutantes nulos y que pueden tener efectos no deseados. El mutante nulo de GAI, *gai-t6*, (Peng et al 1997) no muestra un fenotipo visible aunque es más resistente al tratamiento con PAC que los fenotipos silvestres. Por otro lado, en el cuádruple mutante nulo de DELLA (*gai-t6 rga24 rgl1-1 rgl2-1*) (Achard et al 2006), o en el quintuple mutante (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1 rgl3-1*), las respuestas de la señalización por GAs, como la germinación, elongación, o la floración, están afectadas. De este modo, el alelo GAI^{Bla} se presenta como una posible herramienta biotecnológica para desbloquear la señalización por GAs de una forma más precisa que en los mutantes sin DELLAs, por ejemplo expresando esta versión desde promotores específicos de tejido o inducibles.

3.5 Análisis de QTL.

Para poder concretar qué otros loci están implicados en la variación genética natural de la sensibilidad a GAs en oscuridad hemos

Resultados

realizado un análisis de QTL. Para este abordaje se ha utilizado una colección de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) generada a partir del cruce entre *Ler* y No-0 (Magliano et al 2005). Se seleccionó esta colección porque se ha generado a partir de dos accesiones con comportamientos distintos en presencia de PAC, siendo No-0 parcialmente resistente al efecto del inhibidor. La población obtenida comprende 137 RILs cuyos mapas genéticos individuales han sido establecidos mediante el análisis de 46 marcadores (microsatélites) en los cinco cromosomas (Figura 35) (Magliano et al 2005).

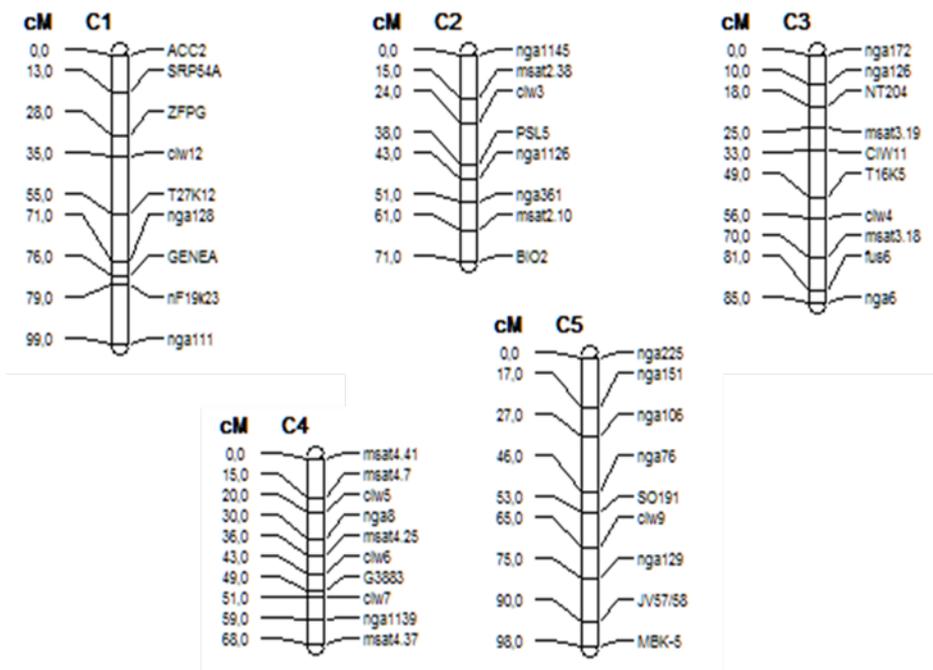


Figura 35. Marcadores de la población de RILs (*Ler* xNo-0). Las distancias entre marcadores (en cM) se indican a la izquierda de cada grupo de ligamiento y los nombres de los marcadores están indicados a la derecha.

La distancia media entre los marcadores es de 11,3 cM, donde la distancia máxima es de 20,7 cM (entre los marcadores nF19k23 y nga111 en el cromosoma I), y la distancia mínima es de 1,50 cM.

Las plántulas de las RILs *Ler* x No-0 se cultivaron durante 7 días en oscuridad con una concentración 1 μ M de PAC. Se realizaron tres réplicas biológicas y se obtuvo la media de la apertura de los cotiledones y de la longitud de los hipocotilos de al menos 15 plántulas de cada línea por réplica, de un total de 125 RILs.

3.5.1 Mapeo de caracteres múltiples:

Los datos se correlacionaron mediante el programa de Cartografía de Intervalos Compuestos (CIM, *Compossite Interval Mapping*) (Zeng 1994). Este método permite controlar la variabilidad genética que puede haber en otras regiones del genoma fuera del intervalo considerado entre dos marcadores puntuales, y de esta forma incrementar el poder de detección de los QTL. El análisis CIM realiza varios tests en los que se ponen a prueba distintas hipótesis alternativas: H₁: $a \neq 0$ y $d = 0$ (modelo aditivo), H₂: $d \neq 0$ y $a = 0$ (modelo de dominancia) y H₃: $a \neq 0$ y $d \neq 0$ (modelo completo). La hipótesis nula en todos los casos es H₀: $a = 0$ y $d = 0$ (ausencia de un QTL). La presencia de un QTL se deduce a partir del valor del estadístico LR (*Likelihood Ratio*) calculado en los tests para cada posición del genoma evaluada (Churchill and Doerge 1994).

El examen fenotípico inicial ha tenido como resultado la identificación de cuatro QTL asociados a la sensibilidad diferencial

Resultados

frente a PAC en la oscuridad en la apertura de los cotiledones: tres en el cromosoma II y uno en el cromosoma III (Figura 36).

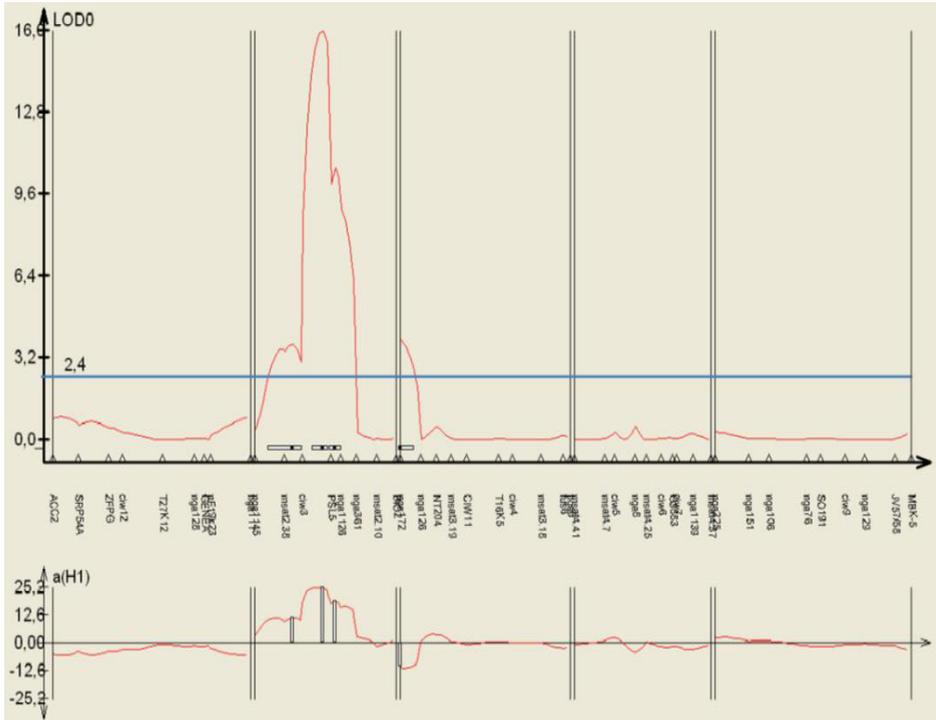


Figura 36. Análisis de QTLs (Ler xNo-o). QTL encontrado por el programa “WIN QTL cartographer” mediante el análisis estadístico *Composite Interval Mapping*, en los cromosomas II y III asociados a la apertura de cotiledones. La línea azul indica el \log_{10} de la razón de verosimilitud (LOD) con un límite mínimo de 2,4 (Lander and Botstein 1989). En la gráfica de la aditividad (abajo), que representa las medias debidas a la contribución de ambos parentales, se puede ver que los QTL del cromosoma II se deben al parental A, es decir a Ler y el QTL del cromosoma III se debe al parental No-o

El QTL principal está localizado entre los genes *PHYB* y *ER* en el cromosoma II (junto al marcador *PSL5*). No se encontró ningún QTL

asociado a la longitud de los hipocotilos en ausencia de GAs, lo que seguramente se deba a que los hipocotilos de No-0 son más largos en oscuridad con y sin tratamiento con PAC (resultados no mostrados).

Los valores de aditividad fueron positivos en los QTL detectados en el cromosoma II, y negativos para el QTL detectado en el cromosoma III (Figura 36, gráfica inferior). Los valores positivos de los efectos aditivos indican que el efecto de sustitución de un alelo A del progenitor *Ler* por un alelo B del progenitor No-0, tiende a reducir la apertura de los cotiledones en ese locus. De acuerdo con esto se puede inferir que la apertura de los cotiledones de los QTL del cromosoma II con valores positivos de aditividad procede del progenitor *Ler*, y en el QTL del cromosoma III, del progenitor No-0.

En el caso del cromosoma II, se identificaron tres QTLs localizados en las posiciones: 15.90 cM (LR = 3.34) asociado al marcador msat2.38; 34.10 cM (LR = 16.62) asociado al marcador PSL5; y 40.70 cM (LR = 10.70) asociado al marcador nga1126. El principal QTL, el II, explicó el 48 % de la variabilidad fenotípica observada ($R^2 = 48 \%$), y mostró un efecto aditivo de 23.94, indicando que el mismo aumenta en 23.94 unidades el valor de la apertura de los cotiledones. El desvío por dominancia para este QTL fue de 11.26 y el tamaño calculado, con un intervalo de confianza del 95% fue de 3.1 cM (Figura 37) que equivale aproximadamente a 650 Kb (≈ 150 genes) (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000, Lin et al 1999, Mayer et al 1999).

Resultados

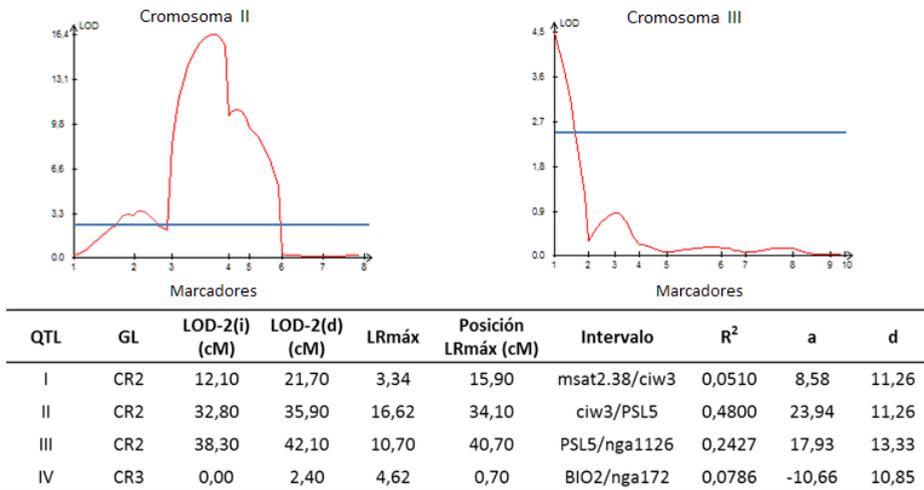


Figura 37. Resumen de los QTL detectados para la apertura de los cotiledones. GL: grupo de ligamiento; LOD-2(i.): posición LOD-2 hacia la izquierda; LOD-2(d.): posición LOD-2 hacia la derecha; LR máx.: valor de LR máximo; Posición LRmáx.: posición del LR máximo; Intervalo: intervalo entre marcadores; R²: proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL; a: efectos aditivos y d: desvío por dominancia.

3.5.2 Análisis de los QTLs detectados:

El principal objetivo que se plantea a la vista de estos resultados es aislar y caracterizar molecularmente el gen o genes que regulan el proceso de desetiación en la oscuridad en ausencia de GAs, responsables del principal QTL identificado en el cromosoma II. Sin embargo, uno de los mayores obstáculos que se presentan es que el mapeo de QTL produce grandes intervalos genéticos, que hacen que sea difícil determinar los mejores candidatos para los genes causales. Además, puede ocurrir que un QTL de gran efecto puede dividirse en

múltiples QTL, donde cada uno de ellos sólo explicaría una pequeña proporción de la varianza total (Balasubramanian et al 2009).

En términos generales, debido al tamaño de los QTL identificados, y al elevado número de genes que se encuentran incluidos en ellos, no es posible afirmar qué gen o genes son los responsables de los caracteres analizados. No obstante, existen varios genes en la literatura, que se han mostrado como partícipes directos en procesos regulados por GAs, que colocan con el QTL II identificado en este trabajo: *At2g21655* (*DUF784*, (Steffen et al 2007)), *At2g23350* (*PAB4*, (Kim et al 2013)), y *At2g20180* (*PIL5*, (Oh et al 2007)). Éste último se conoce también como PIF1, que regula la represión de la fotomorfogénesis en la oscuridad (Leivar et al 2008).

3.6 Estudio de la variabilidad en la respuesta a giberelinas debida a la actividad de factores de transcripción:

Los factores de transcripción (TF) son los principales reguladores de la expresión génica en todos los organismos. Estas proteínas reguladoras han jugado un papel fundamental en la evolución de los eucariotas, en los que a menudo están representados por miembros funcionalmente redundantes de las grandes familias multigénicas. Aproximadamente un 7% de los genomas vegetales está constituido por TFs, lo que nos da una idea de la complejidad de la regulación transcripcional de estos organismos (Udvardi et al 2007). En el caso de *Arabidopsis thaliana*, la secuenciación completa de su

genoma (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000), he permitido determinar que posee alrededor de 1800 TFs, que representan más del 7% de sus genes (Iida et al 2005, Riechmann and Ratcliffe 2000). A pesar de todos los recursos destinados a la investigación de *Arabidopsis* y de la secuenciación de su genoma, menos del 10% de estos TFs han sido caracterizados genéticamente.

Uno de los métodos para conocer las funciones biológicas de los TFs redundantes es su sobreexpresión; sin embargo, cuando se realiza de manera constitutiva, suelen aparecer defectos en el desarrollo que pueden dificultar la caracterización funcional de dichos factores (Kasuga et al 1999).

Esta parte de mi tesis se enmarca dentro del proyecto Transplanta, cuyo objetivo es realizar la caracterización funcional de los TFs de *Arabidopsis thaliana*, estando implicados muchos de los laboratorios españoles que la utilizan como especie de referencia. En el proyecto se han empleado diferentes estrategias destinadas a superar (aliviar) los problemas de redundancia funcional entre TFs y examinar el potencial biotecnológico de éstos en distintas especies de cultivo. En la colección Transplanta de líneas de *Arabidopsis*, se han expresado 949 TFs bajo el control de un promotor inducible por β -estradiol. Hasta el momento se han desarrollado 1.636 líneas homocigotas independientes, lo que representa un promedio de 2,6 líneas por cada TF, para la expresión inducible de un número final de 634 TFs. Todas las líneas homocigotas están construidas en un fondo genético Col-0. Junto con

un reportero GUS-GFP, las líneas Transplanta seleccionadas se han comprobado y confirmado para la expresión transgénica condicionada a tratamiento con β estradiol (Coego et al 2014).

3.6.1 Rastreo de líneas homocigotas:

Para determinar qué otros elementos están implicados en el proceso concreto de la represión de la fotomorfogénesis vía GAs, se realizó un rastreo de las líneas Transplanta buscando TFs que pudieran alterar la respuesta de la planta a la deficiencia en GAs, examinando dos fenotipos en oscuridad: la apertura del gancho apical a los 3 días y la apertura de los cotiledones a los 7 días después del tratamiento con paclobutrazol (Alabadi et al 2004).

Antes de empezar el rastreo se comprobó en las líneas control GUS-GFP-B que el PAC y el β -estradiol no interferían mutuamente en la expresión de la construcción (Figura 38). De este modo se pudo comprobar que el β -estradiol no interfirió en el fenotipo de las plántulas tratadas con PAC, del mismo modo que la expresión de GUS no se veía alterada por el tratamiento con PAC.

A continuación se rastrearon en las condiciones anteriormente mencionadas 1097 líneas homocigotas correspondientes a 540 TFs (Figura 39).

De las 1097 líneas se seleccionaron aquellas resistentes o sensibles a PAC tanto en la apertura del gancho apical como en la

apertura de los cotiledones. En total se seleccionaron líneas correspondientes a 9 TFs, representados al menos por dos clones.

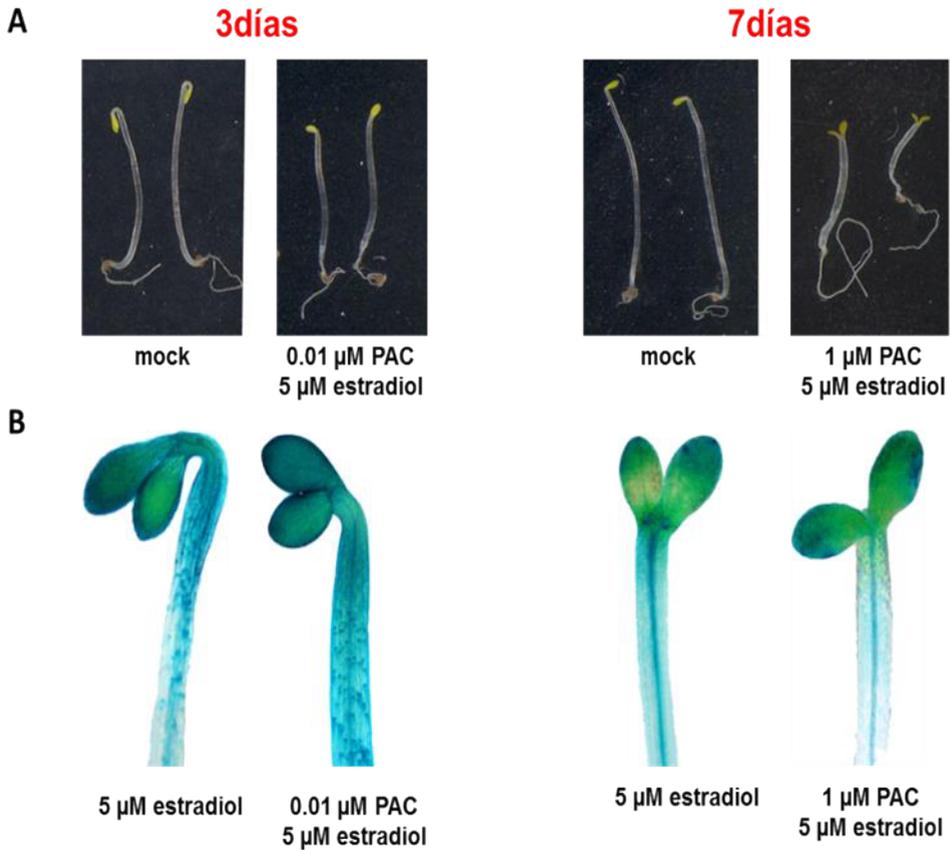


Figura 38. A. Plántulas control GUS-GFP-B cultivadas en oscuridad durante 3 y 7 días en ausencia (mock) y presencia de PAC y de β -estradiol 5 μM . la apertura del gancho apical (3 días) y de los cotiledones (7 días) en presencia de PAC no se ve alterada por el tratamiento con β -estradiol. **B.** Patrones de expresión de plántulas de la línea GUS-GFP-B cultivadas en oscuridad con tratamiento de β -estradiol 5 μM en presencia/ ausencia de PAC. Los patrones de expresión no varían al añadir PAC, ni en las plántulas crecidas durante 3 días ni en las plántulas crecidas durante 7 días.

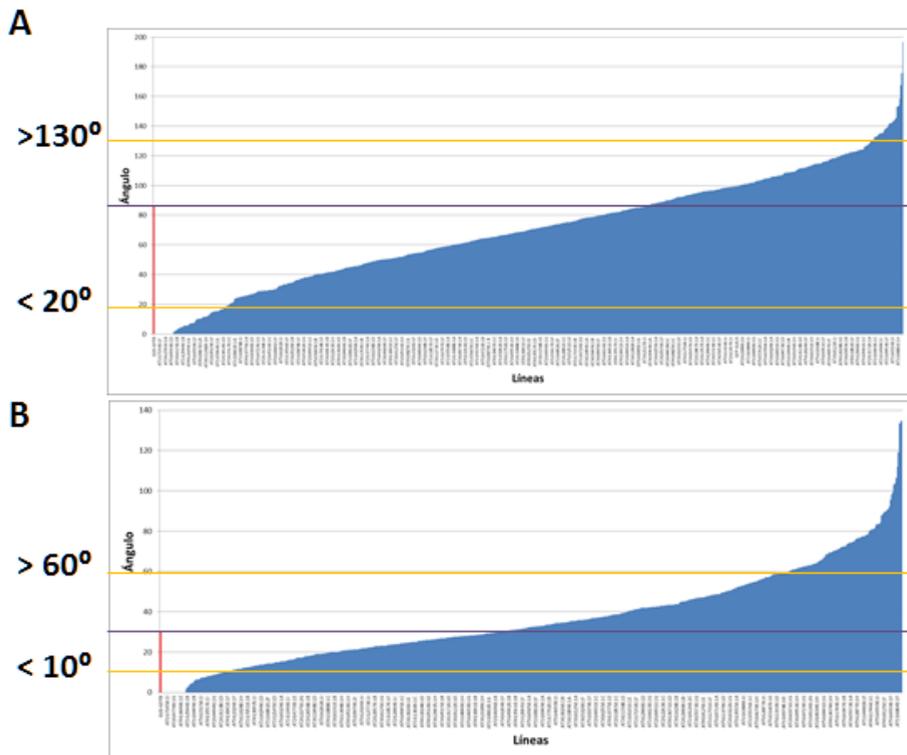


Figura 39. A. Plántulas cultivadas en oscuridad durante 7 días con PAC 1 μ M. Las columnas representan las medias en los ángulos de apertura de cotiledones ($n > 15$) en cada una de las 1097 líneas. La línea morada representa la media de apertura de la línea control GUS-GFP-B ($n > 450$). Líneas con fenotipos extremos: ángulos mayores de 130° y ángulos menores de 20° . **B.** Plántulas cultivadas en oscuridad durante 3 días con PAC 0,01 μ M. Las columnas representan las medias en los ángulos de apertura de los ganchos apicales ($n > 15$) en cada una de las 1097 líneas. La línea morada representa la media de apertura de la línea control GUS-GFP-B ($n > 450$).

Para comprobar que los fenotipos hallados en el rastreo inicial se debían a la inducción del factor de transcripción en ausencia de GAs y no a un efecto de la inserción, se sembraron y analizaron todas las líneas seleccionadas en condiciones distintas (Figura 40).

Resultados

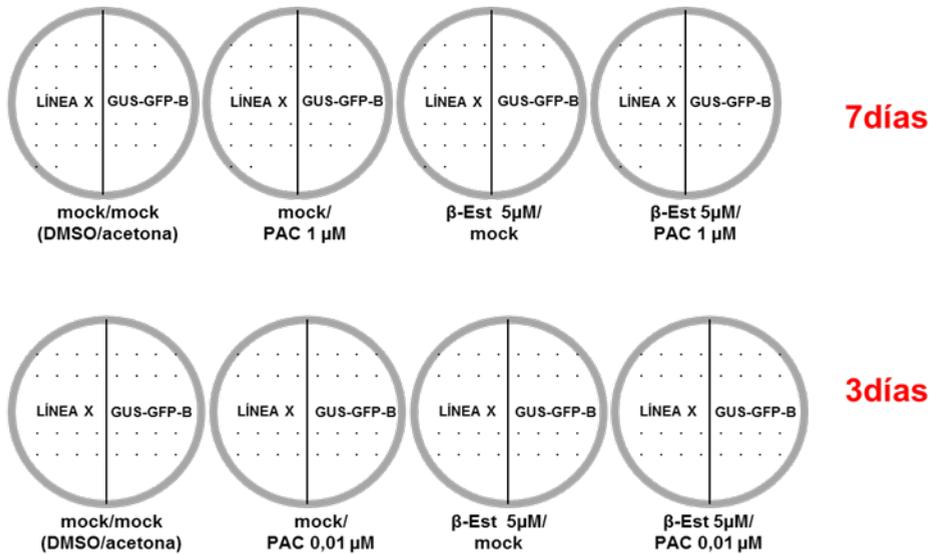


Figura 40. Condiciones de cultivo para todas las líneas seleccionadas. Las plántulas cultivadas con 5 μM de β -Estradiol tenían el mismo fenotipo que las plántulas cultivadas en condiciones control. Las plántulas cultivadas sólo con PAC mostraban el fenotipo de Col-o en las mismas condiciones. Las plántulas cultivadas con PAC y β -Estradiol mostraron un fenotipo extremo.

La mayor parte de las líneas se comportaban igual que en el rastreo inicial (Figura 41). Las primeras líneas (TFs de las familias DOF, NAC, B3, B-Box, MYB y ANT) presentan fenotipo extremo sólo cuando se induce la sobreexpresión del factor de transcripción con β -estradiol, y este fenotipo se puede observar en todos los clones. En cambio, en las líneas correspondientes a los TFs de las familias TCP, MYB y PAN (columnas del final) sólo presentan fenotipo extremo alguno de los clones o el fenotipo aparece en ausencia de GAs sin inducir el factor de transcripción.

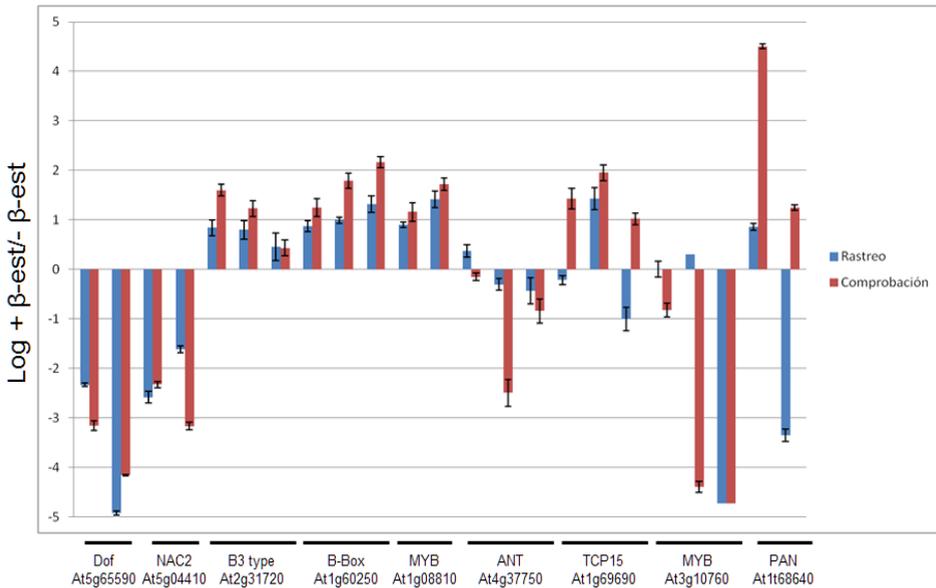


Figura 41. Comprobación de fenotipos extremos hallados en el rastreo inicial. Se representa el log de las ratio entre los TF inducidos (+β-Est) y no inducidos (-β-Est). Las columnas azules corresponden al rastreo inicial y las columnas rojas a la comprobación posterior en las mismas condiciones (n>15). Cada una de las líneas está representada por al menos dos clones. Se puede observar que en la mayoría de las líneas el fenotipo extremo sólo tiene lugar al inducir la sobreexpresión del factor de transcripción con β-Estradiol.

3.6.2 Comprobación de fenotipos extremos:

De las primeras líneas, que son las que cumplen todas las condiciones, se seleccionaron las correspondientes a un TF de tipo B3 *At2g31720* (a partir de aquí lo nombraré como *B3*), porque su expresión se ha visto que está inducida por luz (AtGenExpress Consortium (*Arabidopsis* eFP Browser) (Winter et al 2007)), y la luz tiene un papel fundamental en la apertura de cotiledones.

Resultados

Mediante qRT-PCR, se comprobó que el fenotipo extremo sólo tiene lugar cuando se induce el gen en ausencia de GAs, aunque la inducción no sea la misma en todos los clones (Figura 42).

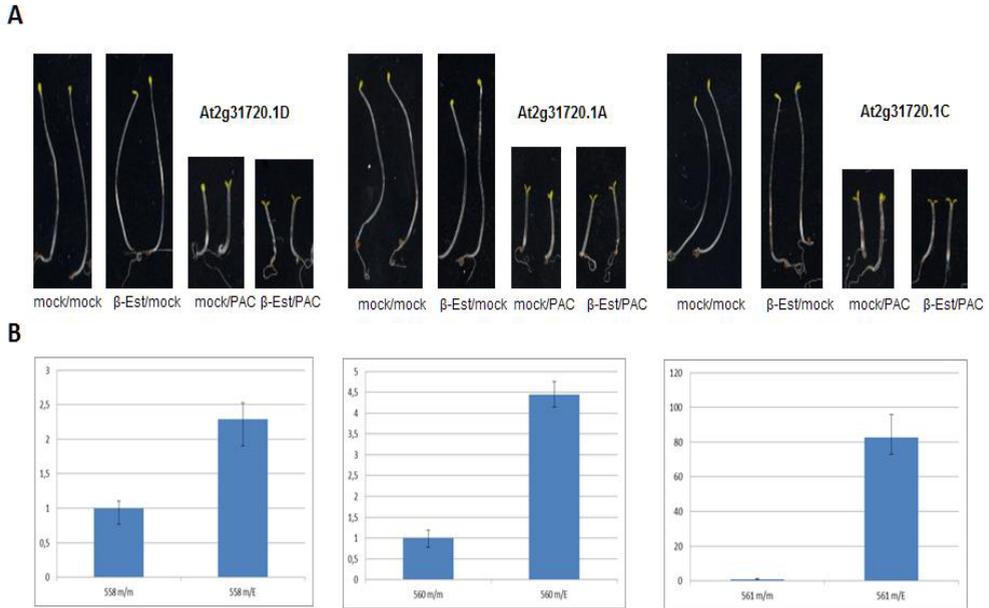


Figura 42. At2g31720. Factor de transcripción tipo B3. A. Fenotipos observados en los tres clones disponibles, en presencia/ausencia de PAC al inducir el factor de transcripción con β -estradiol. **B.** Cuantificación de los niveles de transcrito por RT-qPCR de los distintos clones del gen At2g31720 al inducir su expresión con β -Estradiol.

En el caso de *B3*, los niveles de transcrito aumentan al inducir su expresión con β -estradiol (Figura 42B). Para asegurar que la apertura de los cotiledones en ausencia de GAs se debe a la acción de B3, analizamos la expresión del clon que tuvo un mayor aumento de su expresión al inducir el gen con β -estradiol (Figura 43) en presencia y

ausencia de PAC. Con los resultados obtenidos podemos asegurar que la apertura de los cotiledones se debe a la acción del gen *At2g31720*.

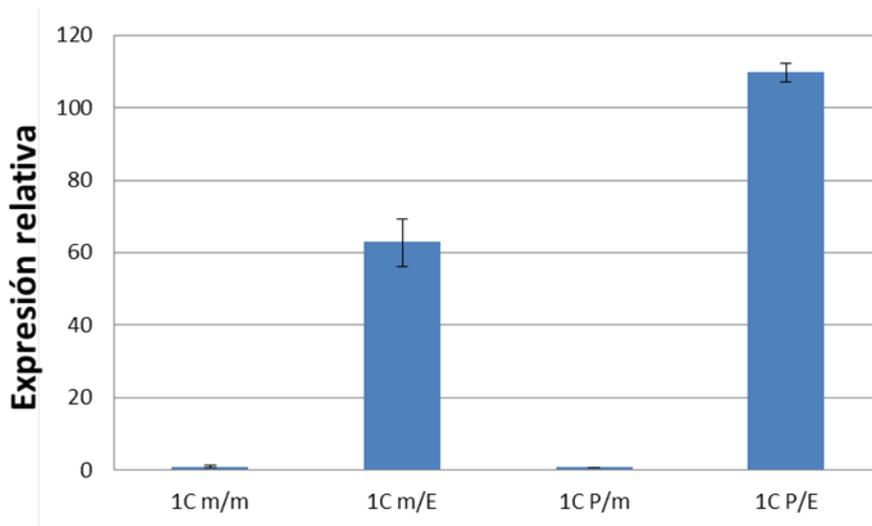


Figura 43. Cuantificación de los niveles de transcrito del clon 1C del gen *At2g31720*. Mediante RTqPCR se ha medido la expresión del TF tipo B3 en presencia y ausencia de PAC al inducirlo con β -estradiol.

Resultados

4. Discusión

4.1 El valor adaptativo de la fotomorfogénesis:

El objetivo del abordaje que se ha iniciado con este trabajo es contestar a la pregunta de si **la represión que ejercen las giberelinas sobre la fotomorfogénesis en la oscuridad tiene un valor adaptativo**; es decir, si la naturaleza ha sometido a presión selectiva a esta vía de señalización para permitir la adaptación de distintas variedades a sus nichos ambientales.

La observación de que existe un alto grado de variabilidad fenotípica (examinando los ángulos entre cotiledones y la longitud de los hipocotilos) en la respuesta de poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana* frente a la falta de GAs, es un buen indicio de que esta regulación puede tener valor adaptativo, aunque para poder realizar esta afirmación con seguridad tendrían que cumplirse otros requisitos. Por ejemplo, deberíamos encontrar una correlación entre el grado de sensibilidad o resistencia a la falta de GAs, y factores ambientales propios del hábitat de cada variedad natural; sin embargo, el único dato disponible en el banco de germoplasma es la latitud y la longitud que determinan la localización inicial de cada accesión, y ninguno de estos parámetros muestra correlación con la sensibilidad a GAs (datos no mostrados). Probablemente son otros parámetros (como la calidad de la luz recibida, o el nivel de sombra provocada por vegetación vecina, o la temperatura media) los que resultan más importantes en la etapa del desarrollo que hemos estudiado.

En general, el análisis de asociación entre variaciones alélicas en genes candidatos y el grado de sensibilidad a GAs no ha resultado muy informativo, y la presencia de polimorfismos en los genes analizados requiere un estudio más detallado para averiguar si estas alteraciones afectan a la función proteica. Algunos de estos polimorfismos de los genes *RGA*, *PIF3* y *GID1a* aparecen en otras plantas como *O. sativa* o *V. vinifera*, indicando que no son residuos esenciales para la función de estas proteínas. En el caso de *GID1b* hemos encontrado numerosos polimorfismos a nivel intrónico: en Sorbo y Ost-0 (accesiones sensibles a PAC) hay una inserción de 31 nucleótidos. Como se ha visto en eucariotas que hay una relación directa entre el mayor tamaño del intrón y un aumento en la tasa de transcripción, podría ocurrir que en estas accesiones tuviera lugar un aumento en el conjunto de estos receptores que podría activar un mecanismo de degradación de exceso de GIDs, promoviendo una mayor desetiología en la oscuridad.

El único caso en el que podría establecerse una conexión entre el fenotipo de hipersensibilidad a GAs y un gen concreto sería el de *Bla-1*. El truncamiento de la proteína *GAI* en esta accesión daría como resultado una proteína no funcional, y se sabe que un alelo nulo de *GAI* en *Ler* también provoca hipersensibilidad a GAs respecto a la apertura de cotiledones (Alabadi et al 2008). Sin embargo, el hecho de que la hipersensibilidad de *Bla-1* sea dominante dificulta la atribución de la causa al alelo *GAI^{Bla}*, salvo que se trate de un alelo dominante negativo. Nuestros resultados indican que *GAI^{Bla}* en efecto se puede expresar como proteína truncada y estable en presencia de GAs, y además es capaz de interactuar con otras proteínas DELLA como *RGA*, lo que

da cuerpo a la hipótesis de que la hipersensibilidad de Bla-1 está asociada a la mutación en *GAI*. No obstante, la prueba más contundente es la inducción de hipersensibilidad a GAs en la accesión Col-0 mediante la introducción del gen *GAI* truncado como en Bla-1. Por lo tanto, salvo que la actividad observada dependa de los 24 aminoácidos extra que se añaden como consecuencia del truncamiento (Figura 26), nuestros resultados indican que las proteínas DELLA pueden formar heterodímeros en *Arabidopsis*, algo ya sugerido en el caso de arroz, donde sólo existe una proteína DELLA (Itoh et al 2002). De este modo, el alelo *GAI*^{Bla} se presenta como una posible herramienta biotecnológica para bloquear de manera suave la señalización por GAs.

Es interesante que una accesión haya seleccionado un alelo mutante de *GAI* de forma natural, ya que este gen también ha resultado ser diana durante la domesticación de cereales en la revolución verde (Barboza et al 2013), así como en la aparición de la variedad *Pinot Meunier* de vid (Boss and Thomas 2002) e incluso en especies como el álamo (Elias et al 2012). Nuestro hallazgo extiende el valor de *GAI* a la selección en condiciones naturales.

Como ya se ha descrito en numerosos trabajos, muchos procesos regulados por GAs también están regulados por otros estímulos y señales endógenas (Alabadi and Blazquez 2009). Los mecanismos moleculares de estas interacciones se están resolviendo poco a poco, aunque queda todavía por determinar si las mismas accesiones con mayor sensibilidad /resistencia a GAs en el mecanismo de desetiación en la oscuridad, también muestran el mismo comportamiento frente a los BRs, las otras hormonas que también reprimen la fotomorfogénesis

en la oscuridad (Alabadi et al 2004, Gallego-Bartolome et al 2012, Li et al 1996).

4.2 Variabilidad transcriptómica de la fotomorfogénesis:

De los 26 genes que se encontraron en el análisis transcriptómico *Ler/No-0* que son dianas directas de *GAI*, al menos dos, presentan comportamientos opuestos frente a la ausencia de GAs: *At2g33380*, que corresponde a una Caleosina (*CLO3*), y *At2g37640*, que corresponde a una Expansina (*EXP3*). Estos dos genes están regulados a su vez por la luz de forma opuesta, de manera que la expresión de *CLO3* se induce al mismo tiempo que se inhibe la expresión de *EXP3* al principio del día (Michael et al 2008, Winter et al 2007).

La proteína *CLO3* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1993), también conocida como *RD20* (*RESPONSIVE TO DESSICATION20* en *Saccharomyces cerevisiae*) es una de las responsables de la floración en *Arabidopsis*. En plantas en las que se está sobre-expresando esta proteína tienen lugar una acumulación de GAs porque se produce una inhibición de los genes *GA2ox1* y *GA2ox2* (Blee et al 2014). Esta acumulación de GAs podría ser la responsable del fenotipo etiolado de la accesión *No-0* cuando crece en presencia de PAC en oscuridad, aunque sería necesario estudiar si tiene lugar esta inhibición en plántulas de 7 días. Sin embargo, en los resultados del análisis transcriptómico, se obtuvo una represión de este gen, lo que podría indicar la existencia de una regulación de tipo *feedback* que

disminuyese la expresión de los transcritos. También cabe la posibilidad de que en la ruta de biosíntesis de GAs en la accesión No-0 no se inhiban los genes *GA2ox1* y *GA2ox2* por acción de CLO3 y el exceso de GAs tenga lugar mediante otro mecanismo.

La proteína EXP3 es una conocida diana de las GAs (Ogawa et al 2003) y aunque el crecimiento de plántulas EXP3-OX en oscuridad no muestra un fenotipo significativamente distinto al compararlas con plántulas silvestres, sí muestran grandes diferencias en desarrollo y crecimiento cuando las semillas se germinan en suelo (Kwon et al 2008). Se ha visto que la expresión relativa de *EXP3* aumenta considerablemente en los mutantes *pil5*, de igual modo que en presencia de luz roja (Oh et al 2007). Como la luz roja y la mutación *pil5* aumentan de forma significativa los niveles de GAs bioactivas (Oh et al 2006), el hecho de que en No-0 el gen *EXP3* se esté expresando en presencia de PAC podría indicar que la biosíntesis de GAs en esta accesión no se ve alterada por el inhibidor y al haber un exceso de GAs, tiene lugar un exceso de EXP3, que correlaciona con un crecimiento etiolado.

Tanto los niveles de expresión en No-0 de EXP3 como de CLO3 apuntan a una acumulación de GAs independiente de su ruta de biosíntesis, lo que explicaría la resistencia de esta accesión al tratamiento con PAC.

A pesar de que la respuesta a la ausencia de GAs de No-0 y *Ler* es similar en las categorías funcionales principales del desarrollo, al analizar las categorías funcionales de los genes que se expresan de

forma diferencial en PAC, se puede ver que la alteración en la respuesta a GAs de No-0 tiene lugar a nivel general y no a nivel particular. Esto podría entenderse como un posible cambio adaptativo a un nicho concreto y por tanto se confirma que el proceso analizado en este trabajo está sujeto a variación genética natural.

4.3 Otros loci implicados en fotomorfogénesis:

Al analizar con detenimiento los QTLs encontrados en el análisis realizado en este trabajo, podemos decir que hay al menos un QTL en el cromosoma II responsable de la variación genética natural de la sensibilidad a GAs en oscuridad. Este QTL (QTL II) se localiza entre los genes *PHYB* y *ER* junto al marcador *PSL5* que explica el 48 % de la variabilidad fenotípica observada ($R^2 = 48 \%$), y muestra un efecto aditivo de 23.94, indicando que el mismo aumenta en 23.94 unidades el valor de la apertura de los cotiledones. Mediante un análisis *in silico* se han propuesto varios genes que co-localizan con el QTL II que podrían actuar como responsables en el proceso estudiado en este trabajo. Algunos de estos genes participan en procesos regulados por GAs, como *PIL5*, y otros se han identificado en el análisis transcriptómico.

El QTL III co-localiza con el gen *ER* que está segregando en la población *Ler/No-0*, ya que *Ler* tiene el alelo de pérdida de función *er-1* (Torii et al 1996). Para determinar si *ERECTA* es un candidato para el QTL III, habría que analizar otra población de RILS como *Ler/Col-0* (Lister and Dean 1993) en la que también está segregando el mismo

alelo, ya que este QTL explicaría el 24,3 % de la variabilidad fenotípica ($R^2 = 24,3 \%$).

Los QTLs más consistentes, el II y el III, podrían ser sometidos a un mapeo de alta resolución o mapeo fino a través del uso de poblaciones NILs (*near isogenic lines*), que permitan acotar el tamaño de los QTLs y facilitar la identificación de los polimorfismos responsables de una proporción de la variabilidad observada para la sensibilidad a GAs en la oscuridad. Este tipo de poblaciones, compuestas por líneas con un mismo fondo genético que difieren en la constitución alélica del fragmento del cromosoma correspondiente al QTL de interés, permitirían obtener las medias fenotípicas de las clases genotípicas para estos QTLs; ya que no estarían segregando otros QTLs. De este modo el carácter se consideraría “mendeliano” (Alonso-Blanco and Koornneef 2000), se podrían estimar las distancias entre los QTLs y los marcadores más cercanos de manera más precisa, obteniendo un región más pequeña, que permitiría evaluar su secuencia e incluso clonarla.

4.4 Otros factores de transcripción implicados en fotomorfogénesis:

El proyecto Transplanta ha permitido empezar la caracterización funcional de los TFs de *Arabidopsis thaliana* con el fin de examinar el potencial biotecnológico de éstos en las distintas especies de cultivo. Unos 30 laboratorios españoles han colaborado en la elaboración de la colección de las 1636 líneas inducibles que expresan 634 TFs (Coego et

al 2014). Esta colección ha hecho posible ampliar la investigación de este trabajo con el fin de poder determinar qué otros elementos están implicados en el proceso concreto de la represión de la fotomorfogénesis vía GAs.

Nuestros resultados apuntan a la implicación de otros elementos, entre los que destacamos el TF de la familia B3, que estaría implicado en la desetiología. Este factor se seleccionó porque mostró un fenotipo de hipersensibilidad a la ausencia de GAs, y porque su expresión está inducida por luz (Winter et al 2007), y la luz tiene un papel fundamental en la apertura de cotiledones. Al analizar la expresión de los transcritos del gen *B3*, obtuvimos una confirmación que indicaba que su sobre-expresión era la responsable de la apertura diferencial de los cotiledones en oscuridad con PAC. De este modo, podemos concluir que el gen *At2g31720* confiere hipersensibilidad a la ausencia de GAs en *Arabidopsis*.

5. Conclusiones

- Existe un alto grado de variación natural en la sensibilidad a GAs durante la regulación de la fotomorfogénesis, lo que sugiere que este mecanismo puede presentar valor adaptativo en *Arabidopsis*.
- No parece existir correlación entre el fenotipo de sensibilidad a GAs y los polimorfismos encontrados en los genes con mayor papel conocido en la regulación por GAs de la fotomorfogénesis, salvo en el caso de *GAI* en la accesión Bla-1.
- El alelo GAI^{Bla} se comporta como un alelo dominante negativo que interferiría con la actividad del resto de proteínas DELLA.
- La alteración en la respuesta a GAs en la accesión No-0 tiene lugar a nivel general y no a nivel particular. Esto podría entenderse como un posible cambio adaptativo a un nicho concreto y por tanto se confirma que el proceso analizado en este trabajo está sujeto a variación genética natural.
- Hay al menos dos dianas directas de *GAI*, que presentan comportamientos opuestos frente a la ausencia de GAs: *CLO3* y *EXP3*. Tanto los niveles de expresión en No-0 de *EXP3* como de *CLO3* apuntan a una acumulación de GAs independiente de

Conclusiones

su ruta de biosíntesis, lo que explicaría la resistencia de esta accesión a niveles bajos de GAs.

- Hay al menos tres QTLs asociados a la regulación de la fotomorfogénesis por GAs entre las accesiones *Ler* y No-0 que se encuentran situados en el cromosoma II.
- Existe al menos un TF (*At2g31720*), denominado *B3*, que confiere hipersensibilidad a la ausencia de GAs en *Arabidopsis*.

6. Materiales y métodos

6.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

En este trabajo se han utilizado poblaciones de *Arabidopsis thaliana* incluidas en el NASC (U. de Nottingham), la población de RILs *Ler* x *No-0* (Magliano et al 2005) y las líneas del proyecto Transplanta. Como accesiones control se han utilizado *Columbia-0* (*Col-0*) y *Landsberg erecta* (*Ler*).

El medio de crecimiento utilizado fue el de Murashige-Skoog: 2,2 g de MS, 15 g de sacarosa, 0,5 g de tampón MES y 7 g de *PhytoAgar*. Se ajustó el pH hasta 5,7 con NaOH 1M. El medio se autoclavó antes de verterlo en las placas. A las placas se les añadió PAC 1 μ M en acetona, o sólo acetona en las placas control.

6.1.1 Siembra y esterilización.

Las semillas se esterilizaron y se colocaron espaciadas sobre las placas. Métodos de esterilización:

a) Esterilización con EtOH: incubando las semillas durante 3 minutos en una solución de etanol 70 % y SDS 0,5 % (100 μ l /100 semillas), y un posterior lavado de 1 minuto con etanol 96 %, dejando que las semillas se sequen en un papel antes de depositarlas sobre las placas. Este tipo de esterilización se ha usado a lo largo de este trabajo para lotes de semillas de menos de 10 accesiones.

b) Esterilización con gas Cloro: incubando las semillas secas durante 5-6 horas en una atmósfera cerrada saturada con gas, producto de la mezcla de 100 ml de lejía con 3 ml de HCl 37 %. Este tipo de esterilización se ha usado a lo largo de este trabajo para lotes de semillas de más de 10 accesiones.

6.1.2 Condiciones de crecimiento.

Después de sembrar y sellar las placas, se envolvieron en papel de aluminio para evitar la luz y se mantuvieron a 4° C durante 6-8 días para romper el letargo y sincronizar la germinación. A continuación se indujo la germinación durante 24 h en luz blanca a 20° C y se volvieron a tapar las placas para su análisis pasados 3 ó 7 días, dependiendo de si se iban a tomar medidas del gancho apical o de la longitud de hipocotilo y de la apertura de los cotiledones, respectivamente.

6.1.3 Extracción DNA genómico, purificación y amplificación:

La extracción de DNA genómico se realizó triturando 20 mg de tejido verde y fresco con un émbolo en un tubo Eppendorff. Se añadió el tampón de extracción (50 ml Tris-HCl 1M pH 7,5; 12,5 ml NaCl 5M; 12,5 ml EDTA; 12,5 ml SDS 10 %; 162,5 ml H₂O), se homogenizó y se centrifugó. Se añadió un volumen de isopropanol al sobrenadante para precipitar el DNA y se centrifugó, eliminando el sobrenadante. Se dejaron secar los tubos abiertos y se resuspendió el DNA en 100 µl de H₂O. El DNA extraído se conservó a -20° C.

La amplificación de genes candidatos se llevó a cabo con las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización durante 15" a 94° C, 30" a 58° C para la hibridación de los oligos y 1'30" a 72° C para la elongación de la cadena. La polimerasa utilizada fue Taq de NETZIME™ y el DNA amplificado se comprobó en geles de agarosa 1 % con bromuro de etidio.

La purificación del DNA amplificado producto de PCR se cuantificó en el Nanodrop™, y se utilizaron 40-50 µg /µl para secuenciar un fragmento de aproximadamente 1000 pb. Métodos de purificación empleados: Kit de Qiagen™ (según las instrucciones del fabricante) o fenolización. Para la fenolización se realizó el siguiente protocolo: sobre 40 µl del producto de PCR se añadieron 260 µl de H₂O y 300 µl de fenol:cloroformo; se centrifugó para ayudar a separar las fases y se extrajo la fase acuosa; se añadió acetato de sodio 3M pH 5,3, 2,5 volúmenes de etanol 100% y se incubaron las muestras 1 hora a -80°C, se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 min a 4°C; a continuación se llevaron a cabo varios lavados con etanol 70 % y 100 % para retirar todas las sales, se volvió a centrifugar y se dejaron secar, para resuspender el DNA en 20-40 µl de H₂O.

6.1.4 Secuenciación:

Los DNA purificados se secuenciaron y se analizó posteriormente cada una de las secuencias con el programa *SeqMan*; utilizando como referencia la secuencia de la accesión Col-0.

Tabla 4. Oligos utilizados en la secuenciación de genes candidatos.

Gen	Código	Oligo (5'-3')	Secuencia Oligo	Referencia
GID1a	At3g05120	GID1aF1	CCCAAATCAAAGTTTCGAGC	Este trabajo
		GID1aR1	GCTCTTGATCTGCATAAGCTG	Este trabajo
		GID1aF2	CCGACACTTAGCTGAGTATC	Este trabajo
		GID1aR2	GCCGCAGACCGCCACACAC	Este trabajo
GID1b	At3g63010	GID1bF1	CAACCCATAAAGGGAAGAGAGAG	Este trabajo
		GID1bR1	CAGAGACAACAACAACACCGC	Este trabajo
		GID1bF2	CCATGGAGGCAGCTTCACTC	Este trabajo
		GID1bR2	CACAACCCAATCATAGATAGGC	Este trabajo
GID1c	At5g27320	GID1cF1	CTTCGATCTGGGCTTTCGTGTC	Este trabajo
		GID1cR1	CACAGAGACAACAACAGCACCACAC	Este trabajo
		GID1cF2	GGCACTTCAACAAGTATTACTG	Este trabajo
		GID1cR2	CTCGGGCTTTCACCTTCCATGG	Este trabajo
HY5	At5g11260	HY5F1	CCCAAGTCCCGCTCTTTTCCTC	Este trabajo
		HY5R1	CCAAACAACCCCATCACGCAACCG	Este trabajo
		HY5F2	GGAAGCGAGGGAGGACACCGGC	Este trabajo
		HY5R2	GAGAACTTGGTCTACAATTGC	Este trabajo
SLY1	AT4G24210	SLY1F	CTCAATCTCTCCTCTCAAATCAA	Este trabajo
		SLY1R	AACAAACTCCAAATACACAAATCC	Este trabajo
PIF3	At1g09530	PIF3F1	AGACGATTTGGTCCCCTCT	Este trabajo
		PIF3R1	CATATCACTCTCTTGCTCGT	Este trabajo
		PIF3F2	ACGGGTTTGAGTCAAGACGA	Este trabajo
		PIF3R2	AGTTCTTGCAGGGCACGCA	Este trabajo
		PIF3F3	GTCCATTCTCAAACCTCACA	Este trabajo
		PIF3R3	TATGTCACGACGATCCACAA	Este trabajo
RGA	At2g01570	RGAF1	CCCTAGATCCAAGATCAGACCTAATC	Este trabajo
		RGAR1	TGCTTCACAAGAGCTTCCGCTA	Este trabajo
		RGAF2	GAACGGTGTTGTTTTAGTCCAC	Este trabajo
		RGAR2	GCTCAAAAACAGAGTTACCGC	Este trabajo
		RGAF3	CTTAGCCGATCTCGATGCTTCG	Este trabajo
		RGAR3	CACTCGACTCGACTCCACCACCG	Este trabajo
GAI	At1g14920	GAIF1	GCAAAACCTAGATCCGACATTGAA	Este trabajo
		GAIR1	CGGTAATCCGCCGCGGAGAGC	Este trabajo
		GAIF2	CGGAGCGATGAGAAAAGTTCGCT	Este trabajo
		GAIR2	CGCACCAGGTCTCCCAAGAGC	Este trabajo
		GAIF3	GTGAGATTGAATCTGTTGCGG	Este trabajo
		GAIR3	CGGAAATCTATCATCATAACCGG	Este trabajo

6.2 Análisis de las plántulas.

Se obtuvo una imagen escaneada de al menos 16 plántulas por condición y genotipo, y se analizó el ángulo entre los cotiledones y la longitud del hipocotilo con el programa *ImageJ*.

6.3 Análisis transcriptómico mediante micromatrices.

Los perfiles transcriptómicos se obtuvieron usando la plataforma de micromatrices de Agilent *Arabidopsis* v4 Gene Expression 4x44K, que contiene 43.803 sondas en forma de oligonucleótidos de 60-mer. Se realizaron 3 réplicas biológicas para cada uno de los tratamientos (PAC y mock) con un total de seis cristales.

El ARN se extrajo usando el kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen™) y su integridad se cuantificó en el Nanodrop™. Se tomó una cantidad de 1 µg de ARN por muestra para sintetizar al menos 10 µg de aARN para su posterior marcaje con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (mock y PAC, respectivamente). La hibridación y el lavado de los cristales se realizó con el kit de hibridación de expresión génica y el buffer de lavado de expresión génica de Agilent.

Después de lavar y secar los cristales, se escanearon en el escáner de Agilent G2565AA, a una resolución de 5 µm, realizando un doble escaneado a alta y a baja intensidad de PMT, para ampliar el rango dinámico de detección. Los archivos de la imágenes fueron analizadas con el software Acuity®. Los análisis entre matrices fueron realizados con el software GeneSpring 11,5 siendo las micromatrices normalizadas por cuantiles. Para garantizar la calidad de los datos,

solamente se consideraron aquellos que cumplieran con los parámetros de “gIsWellAboveBG” con valor igual a 1 en las 3 réplicas biológicas. Para identificar genes diferencialmente expresados en cada comparación, se realizó un análisis de t-test con un *False Discovery Rate* (FDR) ajustado de acuerdo al método de Benjamin y Hochberg. Sólo se seleccionaron aquellos datos con valores $P < 0,05$, después de la corrección por test múltiple, y si el cambio de expresión era de al menos dos veces.

Finalmente las sondas diferenciales se identificaron con sus respectivos genes, basándonos en un análisis de BLAST extraído de la página web <ftp://ftp.Arabidopsis.org/Microarrays/Agilent/>, y se eliminaron todas las sondas que no se correspondían con ningún gen o que hacían referencia a más de un gen.

Mediante la herramienta ReviGO (Supek et al 2011) se han analizado las categorías funcionales sobrerrepresentadas en los genes seleccionados.

6.4 Ensayo del doble híbrido de levadura.

Se han utilizado los vectores de Gateway® pDEST™22 y pDEST™32. En primer lugar, se generó una fusión entre el ORF de GAI^{Bla} y el dominio de unión a DNA en el vector pDEST™32. Las demás ORFs se fusionaron al dominio de activación en el vector pDEST™22.

Se transformaron levaduras (cepa AH109) siguiendo el protocolo que se describe a continuación: en 30 ml de SD + gluc 2 % se

añaden las células, 1,5 ml de la solución con los aminoácidos (1x) y se incuban con agitación a 28 °C durante 1 día y medio. Cuando la OD es mayor de 1,5 se transfieren 15 ml a 300 ml de YPD + gluc 2 % (15 ml). Incubar a 28°C hasta que la OD se encuentre entre 0,4 y 0,6. Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos y resuspender las células en un volumen final de 50 ml de agua estéril. Centrifugar a 1000 g durante 5 minutos y resuspender las células en 1,5 ml de 1X TE/ 1X LiAc estéril. Añadir 0,1 ml de cultivo de levaduras competentes al epp. y mezclar. Añadir 0,6 ml de la solución PEG/LiAc estéril (0,8 ml de PEG 50 %, 0,1 ml de 10 X TE y 0,1 ml de 10 X LiAc e incuban a 28° C durante 30 min. con agitación. Añadir 70 µl de DMSO y mezclar por inversión. Poner en el baño a 42° C durante 15 minutos (*Heat Shock*), centrifugar y resuspender las células en 0,5 ml de agua estéril.

Las levaduras transformadas con la construcción pDEST32-GAI^{Bla} crecieron en medio SD sin leucina y las levaduras transformadas con la construcción pDEST22-X crecieron en medio SD sin triptófano. Para confirmar que todas las levaduras estaban sintetizando las proteínas correspondientes se realizaron ensayos '*western blot*', mediante procedimientos estándar. La presencia de las proteínas fusionadas a los BD y AD se detectó mediante anticuerpos comerciales específicos.

Para el ensayo β -Gal de las interacciones de GAI^{Bla} con distintas proteínas de la vía de señalización de GAs, se picaron las colonias obtenidas de los goteos y se dejaron crecer toda la noche en medio SD con glucosa y uracilo. Se diluyeron los cultivos resultantes en medio YPD con glucosa y se midió la absorbancia.

6.5 Complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC).

Para generar las construcciones se amplificaron las regiones codificantes de los genes *GAI^{Bla}*, *PIF3*, *GAI*, *gai-1*, *RGA* y *GID1a*, y se clonaron en distintos vectores donadores. A continuación se clonaron en los vectores pYFN43 y pYFC43 mediante reacción LR, obteniéndose las siguientes construcciones: nYFP-PIF3, cYFP-PIF3, cYFP-GAI, nYFP-RGA, nYFP-GAI^{Bla}, cYFP-GAI^{Bla}, nYFP-gai-1 y cYFP-gai-1. Se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C-58) con las que se infiltraron hojas de *N. benthamiana*. Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante tres días antes de su observación en el microscopio confocal.

6.6 Expresión transitoria.

Se realizaron las siguientes construcciones: 35S::*GAI*:YFP, 35S::*gai*:YFP y 35S::*GAI^{Bla}*:YFP. Se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C-58) y se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con los cultivos correspondientes de *Agrobacterium*, a razón de dos plantas por construcción. Se analizó la expresión de YFP tres días después de la agro-infiltración. Se roció una planta de cada construcción con una disolución de GA₃ 50 μM y se observó la diferencia de señal a las 24 horas de las plantas +GA₃ frente a las plantas -GA₃.

6.7 Extracción de proteínas de levadura

Partiendo de una OD 5 de levaduras cultivadas en medio selectivo SD-LW, se centrifugaron durante 2 minutos y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada para lavar. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 100 μ l de agua destilada. Se añadieron 100 μ l de NaOH 0,2M y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó y se resuspendió el pellet en 50 μ l de *loading buffer*. Después de hervir 3 minutos, se volvió a centrifugar 2 minutos y se cargaron 6 μ l del sobrenadante por cada pocillo del gel de acrilamida.

6.8 Western blot proteínas de levadura

El análisis Western blot de las proteínas extraídas de levadura se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación: se pone un gel de acrilamida en la cubeta y se añade *Running Buffer* 1X en el centro hasta el borde y fuera hasta cubrir los bornes. Se añaden los μ l necesarios de cada muestra para tener la misma cantidad de proteína y se corre a 100 V durante una hora o hasta que el frente llegue al borde del gel. Se cortan 4 papeles *whatman* de 10 cm por 6 cm y una membrana del mismo tamaño y pone la membrana en una cajita con metanol (2 sg por cada cara). Se pasa la membrana a agua (10 minutos en agitación cada cara) y se pone en Buffer de Transferencia (Tris, glicina, metanol y agua) 10 minutos en agitación a 4° C.

Se prepara un “bocadillo” (todos los componentes humedecidos en buffer de transferencia): en la cara transparente ponemos una

esponja, 2 papeles, la membrana, el gel, 2 papeles y otra esponja, y se cierra. La transferencia se realiza a 80 V (nevera y agitación) durante hora y media. Se tiñe con Ponceau y se escanea. Se preparan 50 ml de PBS-T + 1 g de leche y se bloquea una hora en agitación a temperatura ambiente. Se incuba con el anticuerpo primario O/N a 4° C con agitación.

Se realizan dos lavados con PBS-T ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl, H_2O y Tween 20) durante 30 minutos, un lavado de 15 minutos y otro de 2. Se añaden 2 μl de anticuerpo secundario en 20 ml de solución de bloqueo y se incuba durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizan tres lavados con PBS-T de 30, 15 y 15 minutos, se pone la membrana sobre plástico y se añaden 600 μl de solución A y 600 μl de solución B de Lumigen®. Se retira el exceso de solución de revelado después de un minuto y se coloca la membrana en el cassette de revelado.

6.9 Generación de líneas transgénicas

Se generaron líneas homocigotas en fondo silvestre Col-0 transformadas con la construcción 35S::GAI^{Bla}:YFP. Se obtuvieron 20 transformantes primarios (T1s) de los cuales se seleccionaron tres líneas que presentaban segregación 3:1 (resistente:sensible) al glifosato, conferida por la presencia del transgén en la generación T2 e indicando que éste se había insertado en un único sitio en el genoma.

Tabla 5. Oligos utilizados para el clonaje GateWay de GAI^{Bla}.

Gen	Oligo (5'-3')	Secuencia Oligo	Referencia
GAI ^{Bla}	GAI-Bla-F	ATGAAGAGAGATCATCATCATC	Este trabajo
	GAI-Bla-R	ACCGCTTGTTTGTAGTATACG	Este trabajo

6.10 Análisis de QTLs.

El análisis se llevó a cabo con las RILs generadas entre *Landsberg erecta* (*Ler*) y *Nossen* (No-0). Se sembraron 137 líneas en las mismas condiciones utilizadas para el rastreo inicial de accesiones con fenotipos extremos. Se obtuvo una imagen escaneada de al menos 15 plántulas por condición y línea, y se analizó el ángulo entre los cotiledones y la longitud del hipocotilo con el programa *ImageJ*. El experimento se repitió tres veces y se utilizaron los valores medios obtenidos para cada una de las RILs en el análisis *in silico*.

La metodología que se utilizó para el análisis de QTLs fue la de mapeo por intervalos compuestos (*Mapping and QTL Analysis*). El mapeo de QTL por CIM y la estimación de los valores de aditividad y dominancia se realizaron a través del software QTL Cartographer 2.0 (Wang et al., 2006; [<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>]). Los umbrales de LOD para cada rasgo se calcularon con 5.000 permutaciones (Doerge y Churchill, 1996) y oscilaron entre 2,4 y 2,68 ($P < 0,05$).

6.11 Ensayos con β -glucuronidasa (GUS):

Las plántulas se tiñeron con disolución $K_3Fe(CN)/K_4Fe(CN)$ -X-Gluc. Se incubaron unas 20 plántulas/ ml en oscuridad a 37° C y se les aplicó vacío (*Speed Vacuum*) hasta que los cotiledones se tornaron azulados. Se destiñeron las plántulas con EtOH antes de observarlas en el microscopio.

Las concentraciones de los reactivos de la disolución $K_3Fe(CN)/K_4Fe(CN)$ -X-Gluc, fueron las siguientes:

- Buffer PO_4 50 mM
- $K_3Fe(CN)$ 0,05 M
- $K_4Fe(CN)$ 0,05 M
- EDTA 0,5 M
- Tritón X100 10 %
- X-Gluc (Dimetilformamida) 50 mg/ml

7. Bibliografía

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T *et al* (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94.

Ahmad M, Cashmore AR (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166.

Akira Kawarada HK, Yasuo Seta, Nobutaka Takahashi, Makoto Takai, Saburo Tamura, Yusuke Sumiki (1955). Biochemical Studies on "Bakanae" Fungus. Part XXXV. Relation between Gibberellins, A1, A2 and Gibberellic Acid. *Bull Agr Chem Soc Japan* **19**.

Alabadi D, Gil J, Blazquez MA, Garcia-Martinez JL (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* **134**: 1050-1057.

Alabadi D, Gallego-Bartolome J, Orlando L, Garcia-Carcel L, Rubio V, Martinez C *et al* (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**: 324-335.

Alabadi D, Blazquez MA (2009). Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* **69**: 409-417.

Alonso-Blanco C, Koornneef M (2000). Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci* **5**: 22-29.

Alonso-Blanco C, Mendez-Vigo B, Koornneef M (2005). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* **49**: 717-732.

Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Azevêdo E, Smith, M., Hopkinson, D. A., Harris, H. (1974). A study of possible factors influencing the variation in liver alcohol dehydrogenase activity in individuals of the 'usual' ADH phenotype. *Ann Hum Genet* **38**: 31-37.

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R *et al* (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* **14**: 810-817.

Balasubramanian S, Schwartz C, Singh A, Warthmann N, Kim MC, Maloof JN *et al* (2009). QTL mapping in new *Arabidopsis thaliana* advanced intercross-recombinant inbred lines. *PLoS One* **4**: e4318.

Barboza L, Effgen S, Alonso-Blanco C, Kooke R, Keurentjes JJ, Koornneef M *et al* (2013). *Arabidopsis* semidwarfs evolved from independent mutations in GA20ox1, ortholog to green revolution dwarf alleles in rice and barley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 15818-15823.

Blazquez MA, Weigel D (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**: 889-892.

Blee E, Boachon B, Burcklen M, Le Guedard M, Hanano A, Heintz D *et al* (2014). The reductase activity of the *Arabidopsis* caleosin RESPONSIVE TO DESSICATION20 mediates gibberellin-dependent flowering time, abscisic acid sensitivity, and tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol* **166**: 109-124.

Boss PK, Thomas MR (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**: 847-850.

Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB (1959). Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment

Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**: 1703-1708.

Casal JJ, Fankhauser C, Coupland G, Blazquez MA (2004). Signalling for developmental plasticity. *Trends Plant Sci* **9**: 309-314.

Coego A, Brizuela E, Castillejo P, Ruiz S, Koncz C, del Pozo JC *et al* (2014). The TRANSPLANTA collection of Arabidopsis lines: a resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *Plant J* **77**: 944-953.

Chandler PM (1988). Hormonal regulation of gene expression in the "slender" mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **175**: 115-120.

Chory J, Wu D (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol* **125**: 77-80.

Churchill GA, Doerge RW (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963-971.

de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S *et al* (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484.

de Montaigu A, Toth R, Coupland G (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in genetics : TIG* **26**: 296-306.

Deng XW, Caspar T, Quail PH (1991). cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* **5**: 1172-1182.

Devlin PF, Kay SA (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**: 2499-2510.

Devlin PF, Yanovsky MJ, Kay SA (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**: 1617-1629.

Dill A, Jung HS, Sun TP (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14162-14167.

Dill A, Sun T (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785.

Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP (2004). The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405.

Elias AA, Busov VB, Kosola KR, Ma C, Etherington E, Shevchenko O *et al* (2012). Green revolution trees: semidwarfism transgenes modify gibberellins, promote root growth, enhance morphological diversity, and reduce competitiveness in hybrid poplar. *Plant Physiol* **160**: 1130-1144.

Elliott RaR, JJ and Smith, JJ and Lester, DR and Reid, JB (2001). Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *Journal of plant growth regulation* **20**: 87-94.

Fabian T, Lorbiecke R, Umeda M, Sauter M (2000). The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* **211**: 376-383.

Fankhauser C, Ulm R (2011). Light-regulated interactions with SPA proteins underlie cryptochrome-mediated gene expression. *Genes Dev* **25**: 1004-1009.

Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P *et al* (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 553-563.

Fu J, Keurentjes JJ, Bouwmeester H, America T, Verstappen FW, Ward JL *et al* (2009). System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in Arabidopsis. *Nat Genet* **41**: 166-167.

Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP (2004). The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406-1418.

Gallego-Bartolome J, Alabadi D, Blazquez MA (2011a). DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **6**: e23918.

Gallego-Bartolome J, Arana MV, Vandenbussche F, Zadnikova P, Minguet EG, Guardiola V *et al* (2011b). Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in Arabidopsis. *Plant J* **67**: 622-634.

Gallego-Bartolome J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG *et al* (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13446-13451.

Garcia-Martinez JL, Gil J (2001). Light Regulation of Gibberellin Biosynthesis and Mode of Action. *J Plant Growth Regul* **20**: 354-368.

Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* **21**: 394-407.

Gould PD, Locke JC, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S *et al* (2006). The molecular basis of temperature compensation in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* **18**: 1177-1187.

Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ *et al* (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-3414.

Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**: 1328-1339.

Harmer SL (2009). The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 357-377.

Hazebroek JP, Metzger JD (1990). Thermoinductive Regulation of Gibberellin Metabolism in *Thlaspi arvense* L. : I. Metabolism of [H]-ent-Kaurenoic Acid and [C]Gibberellin A(12)-Aldehyde. *Plant Physiol* **94**: 157-165.

Hedden P, Phillips AL (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530.

Hoecker U, Quail PH (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**: 38173-38178.

Holm M, Deng XW (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated developmental switch. *Plant Mol Biol* **41**: 151-158.

Hsu PY, Harmer SL (2014). Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends Plant Sci* **19**: 240-249.

Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T *et al* (2005). RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **12**: 247-256.

Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y *et al* (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an

ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* **13**: 999-1010.

Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**: 57-70.

Jasinski S, Tattersall A, Piazza P, Hay A, Martinez-Garcia JF, Schmitz G *et al* (2008). PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *Plant J* **56**: 603-612.

Jeong J, Choi G (2013). Phytochrome-interacting factors have both shared and distinct biological roles. *Molecules and cells* **35**: 371-380.

Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology* **17**: 287-291.

Keurentjes JJ, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Blankestijn-De Vries H, Effgen S *et al* (2007). Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics* **175**: 891-905.

Kim DY, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD (2013). Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1523-1540.

Kobayashi M, Spray CR, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J (1996). Gibberellin Metabolism in Maize (The Stepwise Conversion of Gibberellin A12-Aldehyde to Gibberellin A20). *Plant Physiol* **110**: 413-418.

Koornneef M, A. Elgersma, C. J. Hanhart, M. E. P. van Loenen, Rijn Lv (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **65**: 33-39.

Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 141-172.

Kwon YR, Lee HJ, Kim KH, Hong SW, Lee SJ, Lee H (2008). Ectopic expression of Expansin3 or Expansinbeta1 causes enhanced hormone and salt stress sensitivity in *Arabidopsis*. *Biotechnology letters* **30**: 1281-1288.

Lander ES, Botstein D (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199.

Lange T, Hedden P, Graebe JE (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8552-8556.

Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A *et al* (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Current biology : CB* **18**: 1815-1823.

Lester DR, Ross JJ, Smith JJ, Elliott RC, Reid JB (1999). Gibberellin 2-oxidation and the SLN gene of *Pisum sativum*. *Plant J* **19**: 65-73.

Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**: 398-401.

Lichtenthaler HK (1999). The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **50**: 47-65.

Lin C (2000). Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **5**: 337-342.

Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD *et al* (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**: 761-768.

Lister C, Dean C (1993). Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **4**: 745-750.

Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao H *et al* (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2383-2398.

Magliano TM, Botto JF, Godoy AV, Symonds VV, Lloyd AM, Casal JJ (2005). New *Arabidopsis* recombinant inbred lines (*Landsberg erecta* x *Nossen*) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. *Plant Physiol* **138**: 1126-1135.

Mayer K, Schuller C, Wambutt R, Murphy G, Volckaert G, Pohl T *et al* (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**: 769-777.

McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP *et al* (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130.

Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA *et al* (2008). A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS biology* **6**: e225.

Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463.

Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M *et al* (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* **46**: 880-889.

Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-667.

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604.

Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J* **47**: 124-139.

Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I *et al* (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **19**: 1192-1208.

Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D (2008). Sequencing of natural strains of Arabidopsis thaliana with short reads. *Genome research* **18**: 2024-2033.

Oyama T, Shimura Y, Okada K (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* **11**: 2983-2995.

Pearce S, Huttly AK, Prosser IM, Li YD, Vaughan SP, Gallova B *et al* (2015). Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biol* **15**: 130.

Peng J, Harberd NP (1993). Derivative Alleles of the Arabidopsis Gibberellin-Insensitive (*gai*) Mutation Confer a Wild-Type Phenotype. *Plant Cell* **5**: 351-360.

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP *et al* (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205.

Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE *et al* (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261.

Phinney BO (1956). Growth Response of Single-Gene Dwarf Mutants in Maize to Gibberellic Acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**: 185-189.

Phinney BO, West CA, Ritzel M, Neely PM (1957). Evidence for "Gibberellin-Like" Substances from Flowering Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **43**: 398-404.

Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**: 2729-2745.

Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* **18**: 111-119.

Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680.

Quail PH (2000). Phytochrome-interacting factors. *Seminars in cell & developmental biology* **11**: 457-466.

Richards DE, Peng J, Harberd NP (2000). Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *Bioessays* **22**: 573-577.

Riechmann JL, Ratcliffe OJ (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 423-434.

Salter MG, Franklin KA, Whitelam GC (2003). Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* **426**: 680-683.

Schneider G, Schmidt J (1990). Conjugation of Gibberellins in *Zea mays*. *Plant Growth Substances 1988* **R. P. Pharis y S. B. Roods eds., Springer, Heidelberg, Germany, págs.:** 300-306.

Bibliografia

Sharrock M (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell and Environment* **20**: 667-671.

Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169.

Stavang JA, Gallego-Bartolome J, Gomez MD, Yoshida S, Asami T, Olsen JE *et al* (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J* **60**: 589-601.

Steffen JG, Kang IH, Macfarlane J, Drews GN (2007). Identification of genes expressed in the Arabidopsis female gametophyte. *Plant J* **51**: 281-292.

Sultan SE (2003). Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution & development* **5**: 25-33.

Sun T (2000). Gibberellin signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 374-380.

Sun TP (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* **154**: 567-570.

Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**: e21800.

Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4698-4703.

Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE (1999). Gibberellin signal transduction presents ellipsis to the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* **4**: 424-428.

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF *et al* (1996). The Arabidopsis ERECTA gene encodes a

putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**: 735-746.

Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998). Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* **118**: 1517-1523.

Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A *et al* (2007). Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol* **144**: 538-549.

Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M *et al* (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698.

Valladares F, Gianoli E, Gomez JM (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytol* **176**: 749-763.

von Arnim AG, Deng XW (1994). Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* **79**: 1035-1045.

Weigel D (1995). The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis. *Annual review of genetics* **29**: 19-39.

Weigel D (2012). Natural variation in Arabidopsis: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiol* **158**: 2-22.

Weston DE, Elliott RC, Lester DR, Rameau C, Reid JB, Murfet IC *et al* (2008). The Pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol* **147**: 199-205.

Whitelam HSGC (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**: 840-844.

Williams J, Phillips AL, Gaskin P, Hedden P (1998). Function and substrate specificity of the gibberellin 3beta-hydroxylase encoded by the Arabidopsis GA4 gene. *Plant Physiol* **117**: 559-563.

Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718.

Yadav V, Kundu S, Chattopadhyay D, Negi P, Wei N, Deng XW *et al* (2002). Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in Arabidopsis. *Plant J* **31**: 741-753.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Molecular & general genetics* : *MGG* **236**: 331-340.

Yamaguchi S, Kamiya Y (2000). Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* **41**: 251-257.

Yamaguchi S (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 225-251.

Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM (2004). Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7827-7832.

Zanewich KP, Rood SB (1995). Vernalization and Gibberellin Physiology of Winter Canola (Endogenous Gibberellin (GA) Content and Metabolism of [3H]GA1 and [3H]GA20. *Plant Physiol* **108**: 615-621.

Zeng ZB (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**: 1457-1468.

Zi J, Mafu S, Peters RJ (2014). To Gibberellins and Beyond! Surveying the Evolution of (Di)Terpenoid Metabolism. *Annu Rev Plant Biol.*

Bibliografia

Abreviaturas

ABA ácido abscísico

AD *activation domain*

A. tumefaciens *Agrobacterium tumefaciens*

At *Arabidopsis thaliana*

ATP adenosina trifosfato

Aux Auxinas

BD *binding domain*

Bla Blanes

BRs Brasinosteroides

CAB2 *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 2*

CCA1 *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*

CDKs ciclinas dependientes de quinasas

cDNA *complementary DNA*, ADN complementario

CIM *Compossite Interval Mapping*, Cartografía de Intervalos Compuestos

cM centiMorgan

Col Columbia

COP1 *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1*

Cq Citocininas

CRY criptocromo

Abreviaturas

Da Daltons

DMAPP dimetilalil difosfato

DNA *desoxiribonucleic acid*, **ADN**, ácido desoxirribonucleico

EDTA ácido etilen-diamino-tetracético

FDR *false discovery rate*, tasa de falsos positivos

Fig. figura

GAs giberelinas

GA2ox GA2-oxidasa

GA3ox GA3-oxidasa

GA20ox GA20-oxidasa

GAI *GIBBERELIC ACID INSENSITIVE*

GGPP geranylgeranyl bifosfato

GID1 *GA INSENSITIVE DWARF1*

GO gene ontology, ontología génica

GST glutatión S-transferasa

HY5 *LONG HYPOCOTYL 5*

HS *heat shock*

ILs *introgression lines*, líneas de introgresión

IPP Isopentenil difosfato

kb kilobases

lacZ β-galactosidasa (**β-Gal**)

LB medio Luria-Bertani

Ler *Landsberg erecta*

LHCB *LIGHT HARVESTING COMPLEX A/B BINDING*

LHY *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*

LR *Likelihood Ratio*

MEP fosfato de metileritriol

min minuto/minutos

mRNA RNA mensajero

N. benthamiana *Nicotiana benthamiana*

NILs *near isogenic lines*, líneas casi isogénicas

No-0 Nossen

O. sativa *Oryza sativa*

PAC Paclobutrazol

pb pares de bases

PCR *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PHY fitocromo

PIF4 *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*

QTL *quantitative trait loci*, loci de rasgos cuantitativos

RbcS *RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN*

RGA *REPRESSOR OF gal-3*

RGL *RGA-LIKE*

Abreviaturas

RILs *recombinant inbred lines*, líneas recombinantes puras

RNA *ribonucleic acid*, **ARN**, ácido ribonucleico

sd desviación estándar

SDS dodecil sulfato sódico

SLY1 *SLEEPY1*

SNPs *Single Nucleotide Polymorphism*

SPA1 *SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A1*

SSD *Single Seed Descent*

TAE Tris-acetato-EDTA

TAIR *The Arabidopsis Information Resource*,
<http://www.arabidopsis.org/>

TFs factores de transcripción

TOC1 *TIMING OF CAB EXPRESSION 1*

Tris 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

TPS terpeno sintasa

UTP uridina trifosfato

UV ultravioleta

V.vinifera *Vitisvinifera*

YFP *yellow fluorescent protein*